

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

Variación en la composición química del micelio del aspergillus terreus con el tiempo de incubación

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Fuensanta Reyes Ramírez

DIRECTOR:

Rafael Lahoz Oliver

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5326701512

T 1

547.1

REY

Universidad de Madrid.

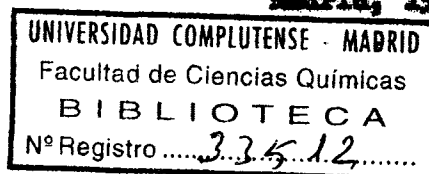
Facultad de Ciencias.

VARIACION EN LA COMPOSICION QUIMICA DEL MECELIO DEL ASPERGILLUS TERREUS CON EL TIEMPO DE INCUBACION.

Tesis Doctoral.

Fuencanta Reyes Ramirez.

Madrid, 1964.



b16277405
C38057943

P R E F A C I O.

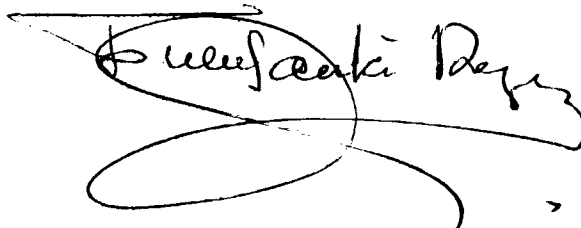
Este trabajo fué realizado desde Febrero del 1.962, hasta Julio del 1.964.

Deseo expresar mi profunda gratitud al Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología del C.S.I.C., en el que he sido becaria desde que comencé este trabajo, y que me ha facilitado los medios necesarios para realizarlo.

Igualmente me es grato, manifestar mi agradecimiento a todo el personal del Departamento de Microbiología de este Instituto y en particular a la Sra. M^a L. Lién Peña, por su aportación a este trabajo.

Finalmente quiero destacar mi mas cordial agradecimiento al Dr. D. R. Lahoz Oliver, a quién debo la mayor parte de mis conocimientos en Bioquímica y que ha dirigido este trabajo de Tesis Doctoral, prestandome en todo momento su ayuda moral y colaboración.

Madrid, Septiembre 1.964.

A large, stylized handwritten signature in dark ink, which appears to read "Encarnación Pérez". The signature is written in a cursive, flowing style with a large loop at the bottom.

INDICE

	Pag.
I .- INTRODUCCION	1
II .- MATERIALES Y METODOS	22
1º.- Método de Semagyi	28
2º.- Cromatografía de azúcares	35
3º.- Método de Fiasco y Subbarow	42
4º.- Método de Gerold Schwarzenbach	48
III. - PARTE EXPERIMENTAL	55
IV .- RESULTADOS	142
V .- DISCUSION	151
VI.- RESUMEN	160
VII .- CONCLUSIONES	162
VIII.- BIBLIOGRAFIA	164

INTRODUCCION.

Sabido es el importante papel que los hongos inferiores o mohos desempeñan en la naturaleza. Mediante reacciones bioquímicas por ellos provocadas sobre residuos vegetales y animales degradan sus constituyentes hasta que sus elementos retornan a la economía de la naturaleza en forma de anhídrido carbónico, amoníaco, etc.

Desde la más remota antigüedad el hombre ha venido usando de estos microorganismos de un modo más o menos directo tales como en la elaboración de bebidas, ciertos alimentos, etc.

Como se sabe la importancia económica de estos microorganismos es grande, revistiendo especial importancia en las zonas forestales. Para apreciar esto nos basta considerar la vegetación arbórea y el tremendo daño que ocasionan las enfermedades por ellos producidas. Así mismo en todas las industrias que manejan materiales orgánicos, como son las de producción de alimentos, cueros, textiles, maderas, etc, existe continuamente el riesgo de las infecciones por hongos de los materiales producidos, lo que acarrea el deterioro de los mismos con la consiguiente

te pérdida.

Siendo el suelo un admirable medio de cultivo para los mohos, se cree, en la actualidad, que los productos metabólicos que pudieran formarse por estos microorganismos ejercen una profunda influencia sobre otros organismos del suelo y sobre las plantas verdes que crecen en este suelo. De ser así, y en ciertas ocasiones parece haberse comprobado experimentalmente, los antibióticos producidos por estos mohos protegerían de infecciones a las plantas superiores. Un caso bien conocido es la protección que las semillas de ciertas plantas reciben cuando se tratan previamente por soluciones del antibiótico segregado por el Penicillium expansum. Esto evita el ataque de tales semillas por el Pythium en los suelos infectados con éste patógeno.

Con todo lo que antecede puede verse la importancia del papel que estos microorganismos desempeñan en la naturaleza y su intervención en la vida y actividades del hombre.

Todas estas razones son suficientes para justificar el esfuerzo y los desvelos que el estudio de estos seres pudiera acarrear. El estudio de la bioquímica de estos microorganismos, por ejemplo, ha permitido encausar estas actividades químicas de

manera que convenientemente dirigidas y controladas se han logrado beneficios que bien justifican los esfuerzos de que anteriormente se habla. Abundantes e importantes ejemplos se verán a continuación.

Al comienzo del siglo actual muy pocos eran los roles utilizados en procesos industriales. Solamente algunas especies de los géneros Mucor y Phizopium se empleaban para la fabricación del alcohol etílico, y diversas especies del género Aspergillus intervenían en la elaboración del ácido gálico a partir del tanino. En los últimos cincuenta años puede decirse que el panorama sufre un cambio total, pues se desarrollan un gran número de industrias cuyo fundamento se asienta principalmente en el uso y manejo, bajo riguroso control, de estos microorganismos. Son ya clásicas en este aspecto las fabricaciones industriales de los ácidos glutámico y cítrico, resultantes ambos en la fermentación del Aspergillus niger empleando como sustrato materiales azucarados. Este método de obtener el ácido cítrico ha desplazado totalmente al que se seguía antiguamente y que consistía, como es sabido, en la extracción del mismo a partir de los frutos del género citrus, principalmente limones. En la actualidad, y sólo en los Estados Unidos, produce por fermentación una

sóla compañía (Chas. Pfizer and Co.) la mitad aproximadamente de las 13.000 toneladas a que asciende la producción total anual en dicho país. Así mismo la preparación de vitaminas por fermentación, concretamente la riboflavina obtenida en gran escala mediante un proceso fermentativo, constituye otro buen ejemplo del alcance, utilidad y aplicación práctica de estos microorganismos que nos ocupan y que tan ampliamente exploran la gran extensión de que han sido objeto en estos últimos años.

Con estos procesos industriales que acabamos de mencionar y que hoy producen muy bien considerarse ya como clásicos dentro del campo de las fermentaciones causadas por hongos, desarrollamos en lo que ha dado en llamarse "era de los antibióticos". Esta puede considerarse abierta con el descubrimiento de la penicilina y su subsecuente industrialización. El gran esfuerzo dirigido a cabo por la tecnología industrial permitió la fabricación, en gran escala, de este antibiótico. A esto siguió la estreptomicina producto metabólico del Streptomyces griseus. Como la microbiología industrial puede decirse que se había ya inaugurado con la penicilina la fabricación en gran escala de la estreptomina fue casi inmediata. De esta manera siguió la van-

queda de nuevos antibióticos con frecuentes hallazgos *afortunados* (tetraciclinas, etc.) y sus subsecuentes fabricaciones industriales.

Los estudios en muchas laboratorias del mundo *encaminados* al descubrimiento de nuevos antibióticos, han dado al estudio de estos microorganismos, una buena parte del gran desarrollo que hoy posee esta rama de la biología. Como sucede en otras ramas del saber, los estudios científicos organizados sobre el *tabolismo* de hongos, comienzan a realizarse como resultado de las aplicaciones industriales. Esta búsqueda de nuevos antibióticos condujo al descubrimiento de muchas sustancias elaboradas por estos microorganismos. En grande la cantidad, de productos *metabólicos* de hongos conocidos en la actualidad, que sin tener aplicación en Medicina, poseen indudable valor por su importancia desde el punto de vista *sociológico*, ya que nos permiten llegar a un más completo conocimiento del mecanismo íntimo que rigen los procesos metabólicos de los microorganismos que nos ocupan.

La búsqueda de productos metabólicos comienza históricamente con el descubrimiento del ácido oxálico por el botánico alemán Carl Rehner en 1.891, (45). Esta sustancia ya había si-

de detectada en forma de cristales de oxalato cálcico en los tejidos de los hongos, por varios observadores, pero fué Wehmer (48) quién primero lo reconoció como un producto definitivo del metabolismo del Aspergillus niger. También fué este mismo investigador (Wehmer 1.893) (49), quién descubrió por vez primera el ácido cítrico como producto de fermentación. Lo obtuvo cultivando especies de Citrovosca en un medio sintético el cual contenía azúcar como única fuente de carbono.

A estos descubrimientos siguieron los de los ácidos fumárico y de-glucónico por Ehrlich (1.911) (16), y Molliard (1.922) (31), respectivamente. El primero procedente de la fermentación del Mucor stolonifer y el segundo como producto metabólico del Aspergillus niger. El mismo Wehmer (1.928) (50) descubre más tarde el ácido málico en pequeñas cantidades, como resultado de la fermentación del Aspergillus fumigatus sobre glucosa.

Las grasas producidas por mohos pareos fueron ya observadas en 1.926 por Belin (3) quién logró obtener ciertas cantidades de materiales lipídicos a partir del micelio del Aspergillus niger. Un año más tarde (1.927) Barber (1) describe el aislamiento de grasa de una cepa de Penicillium que no fué identi-

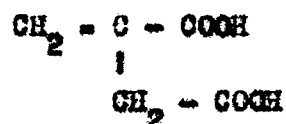
ficada.

Más tarde se comprobó que la mayoría de los hongos eran capaces de sintetizar grasa y que la cantidad producida era variable entre amplias límites. Así Ward (47) y colaboradores examinaron la grasa producida por 61 hongos diferentes de los cuales 39 eran *penicillium* y 22 *aspergillus*. Del análisis de todos estos hongos resultó que 10 contenían más del 15 % de grasa, 6 más del 20% y el resto producían cantidades relativamente pequeñas, pero siempre apreciables.

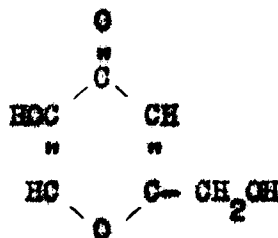
En la actualidad algunos de los factores que afectan la formación de grasa por estos microorganismos han sido estudiados con cierto detenimiento por Garrido y Walker (1,956) (21).

En la época moderna ocupan lugar preeminente los estudios efectuados por H. Bastrick y sus colaboradores en el departamento de Bioquímica de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de la Universidad de Londres, donde desde 1,923, se vienen dedicando al estudio sistemático de los productos del metabolismo de cultivos puros de diferentes especies y cepas de hongos. En aquel laboratorio, y por espacio de 30 años, aquellos investigadores aislaron cerca de 200 productos metabólicos diferentes en estado de pureza.

En dos aspectos pueden los mohos considerarse como modelos para estudios fisiológicos. En el primero están aquellas nuevas reacciones bioquímicas, específicas de ciertos mohos y que anteriormente eran desconocidas en otros sistemas biológicos. Como ejemplo de lo que antecede se podrían citar aquí los ácidos itacónico y kójico, el primero descubierto en 1.929, por Kinoshita (26),



en el Aspergillus itaconicus, y el ácido kójico aislado por vez primera del micelio del Aspergillus oryzae por el investigador, también japonés, Saito (18) en 1.937. Esta sustancia fue extraída con



éster sulfúrico y obtenida en forma cristalina como agujas incoloras. Este compuesto constituye un buen ejemplo de sustancia desconocida en la Química Orgánica antes de ser descubierta en

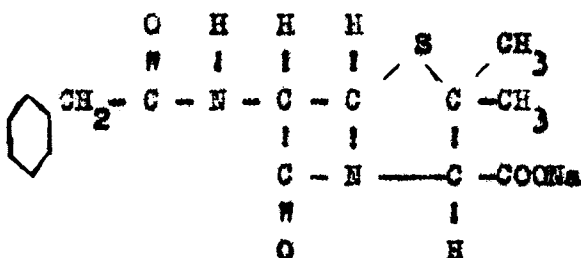
hongos.

En el segundo aspecto, el empleo de los hongos como medio para el estudio de reacciones bioquímicas generales de los tejidos animales y que ocurren por lo general con mayor intensidad en los hongos, hace de estos, elementos ideales para este tipo de estudio.

Otra interesante particularidad de estos microorganismos, en su empleo en la investigación fisiológica, es que permiten trabajar en condiciones mejor controladas que empleando otros sistemas. (Foster 1.945) (20).

La posibilidad de cultivarlos fácilmente en medios sintéticos reproducibles y químicamente definidos, a la vez que bien equilibrados en lo que respecta a los nutrientes hace de estos microorganismos magníficas herramientas en manos del bioquímico. Así mismo su capacidad de asimilación y la actividad fisiológica elevadas los hacen muy eficientes en la conversión del sustrato en material celular. En general un medio bien compuesto que contenga una fuente de nitrógeno, algún carbohidrato, sales minerales y un acceso de oxígeno suficiente a las células basta en la mayoría de los casos para que se desarrolle una ma-

sa comparativamente grande de material celular. Una buena idea del poder sintético extraordinariamente grande de estos microorganismos la podemos obtener con solo considerar, que a partir de una molecula tan relativamente simple como es la de glucosa llegan a elaborar otra tan compleja como lo es la de penicilina



Así mismo es digno de considerar la facilidad con que estos microorganismos responden a ligeras variaciones en las condiciones iniciales impuestas en el medio. Esta respuesta suele ser muy marcada de manera que las alteraciones obtenidas en el metabolismo, permiten acentuar las fases que interesan quedando así más fácilmente expuestas a investigación. Un buen ejemplo de esta respuesta es la formación de ácido cítrico u oxálico exclusivamente, con solo variar ligeramente el pH del medio donde se cultivan ciertas cepas de Aspergillus niger.

En general se observa que cuando las condiciones de cre-

oimiento de un hongo filamentosos son favorables, los cultivos de estos microorganismos entran en una primera fase ó fase estacionaria, la cual comienza recién inoculado. A esta sigue una segunda etapa en la vida del organismo llamada fase de crecimiento, en la cual aumenta continuamente el material celular, bien por aumento del número de células o bien debido al aumento del peso de los materiales almacenados en las mismas. Y finalmente existe una última fase llamada de decline o autólisis la cual se caracteriza por una pérdida constante en el peso seco de micelio, simultanea con la liberación de nitrógeno en forma de amoníaco así como una gran variación en el pH del medio. Naturalmente la duración de estas fases que se enumeran depende del organismo que se considere y de las condiciones existentes tales, como composición del medio, temperatura, pH, etc. Cada una de estas fases de crecimiento se caracteriza por la variación en la composición química del organismo que se estudia y que naturalmente se dan como una consecuencia del proceso vital. Las primeras fases y concretamente la del crecimiento, han sido desde antiguo motivo de amplios y abundantes estudios. Si se pasa revista detenidamente a la literatura sobre fisiología de hongos se verá lo poco abundantes que aparecen en la misma los eg

tudios sobre la fase autolítica del crecimiento. Puede decirse que prácticamente casi todos los estudios llevados a cabo sobre metabolismo de hongos han sido efectuados en general en cultivos cuyo tiempo de incubación abarcaba totalmente la fase inicial y la de crecimiento, sin apenas entrar en el período de autólisis. En otros casos en que el período de incubación era relativamente largo y el cultivo entraba ampliamente en la fase autolítica este fenómeno no era estudiado, ya que no era este el objeto para el cual la experiencia había sido proyectada. Esto en principio se refiere a los cultivos estacionarios que como se sabe cronológicamente es el primer método seguido en el cultivo de hongos. Al introducirse más tarde en la metodología el sistema de cultivos con agitación no puede decirse que los estudios de la fase autolítica del crecimiento hayan recibido una mayor atención pues exceptuando algún estudio aislado no existe ninguno que se ocupe de este fenómeno. La escasez de estudios de esta naturaleza unido a la importancia que pudiera tener el estudio de la bioquímica de ésta fase final de la vida de estos microorganismos fué lo que nos impulsó a investigar algunos aspectos sobre la variación química que experimente el micelio del

Aspergillus terreus durante la fase autolítica del crecimiento.

A continuación pasamos revista, agrupando cronológicamente, las investigaciones realizadas en este aspecto de la vida de los hongos filamentosos.

Una de las primeras observaciones concernientes con la autólisis fué la liberación de amoníaco; así Dorr y Maynard notaron este hecho en 1.912 (14) y lo atribuyeron a descomposición de las proteínas. En un estudio posterior (1.913) (13), para Dorr la autólisis tiene lugar cuando cesa el crecimiento y éste cesa por agotarse el carbohidrato o los carbohidratos del medio. Sin embargo Brown (1.923) (9) estima que la autólisis sucede como consecuencia de la acumulación de metabolitos de naturaleza tóxica. Klotz (1.923) (27) también asocia la autólisis a la liberación de amoníaco. No fué hasta 1.924, en que C. Boyle (8) inicia estudios sobre autólisis con detalle ocupándose en el estudio de las reacciones de ciertos hongos frente a sus productos de autólisis, y especialmente G.A.Pratt (34) quién en 1.924 lleva a cabo la primera investigación química del envejecimiento o "staling" por el hongo Fusarium fructigenum. Para

ello cultiva este microorganismo en el medio de Richard y sigue con bastante detalle la marcha del fenómeno desde el punto de vista químico determinando analíticamente los productos que aparecen como resultado de la autólisis. El punto de vista expuesto por Brown en 1.923 (9) reaparece de nuevo en 1.925, mantenido esta vez por Fawcett (18) quién sostiene que la acumulación de metabolitos tóxicos detienen el crecimiento y motivan la autólisis. Bartels en 1.927 (7) observó un paralelismo entre la autólisis y una coloración rojo-violeta que aparecía en el medio al alcalinizar éste. Otros investigadores observan una correlación entre autólisis y el color marrón rojizo del líquido de cultivo (Metz 1.930) (29).

Es G. Behr quién en 1.930 (2) inicia estudios sistemáticos y tal vez los más completos existentes sobre la fase autolítica del crecimiento en microorganismos. Este autor cultiva el Aspergillus niger durante un largo período de tiempo (172 días) en un medio fisiológicamente básico (NO_3Na) y en otro medio fisiológicamente ácido con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. En ambos medios el autor estudia con primordial atención la química del nitrógeno en relación con la autólisis. Así mismo compara la extensión del fe-

número (autólisis) en ambos medios llegando a la conclusión de que el fenómeno se verifica con mayor extensión en el medio más lógicamente básico. En el mismo año (1.930) aparece otro trabajo debido a Behr y Rippel (37) en el que tratan de la liberación del magnesio durante la autólisis, siendo ésta la primera vez que se trata de los elementos minerales durante la autólisis de hongos. Los mismos autores que se acaban de citar estudian la liberación de azufre durante la autólisis (1.936) (38). Woolley y Petersen (52) estudian en 1.937, la variación del nitrógeno durante la autólisis encontrando que un 6% del nitrógeno del micelio pasa en disolución al agua. Como puede verse la gran mayoría del trabajo químico efectuado sobre la fase autolítica del crecimiento versa casi únicamente sobre la química del nitrógeno en diferentes aspectos como son liberación de amoníaco, aparición de aminoácidos en el medio y ruptura de las moléculas proteínicas.

Seguen las apariciones esporádicas de trabajos que versan sobre elementos minerales en el proceso autolítico así Kell-Durand (1.938) (30) se ocupa de la liberación de compuestos orgánicos conteniendo fósforo. Son dignos de citar los trabajos de Chang en 1.940 (12) y Semenzuk en 1.944 (41) quienes llegan

a opinar que la autólisis viene marcada por la aparición de fosfato, primeramente inorgánico, en el medio. De nuevo vuelven a hacer aparición otros trabajos sobre liberación de azufre; en 1.946 por Heckenhull, (22), en 1.948 por Raistrok (36) y más recientemente (1.950) de nuevo por Heckenhull (23). Crewther y Lennox (1.953) (11) estudian los cambios químicos que en general tiene lugar en el líquido de cultivo donde se había autolizado el Asp. GYSS.

Casi todos los estudios citados anteriormente se hacían siguiendo el método clásico de cultivo estacionario y tomando periódicamente una muestra directa para el análisis. Se llama muestra directa a la constituida por uno o varios matraces conteniendo el micelio junto con el líquido de cultivo en el cual el micelio sufre la autólisis. Filtrando esta muestra se obtienen dos fases, una sólida (micelio) y otra líquida (líquido de cultivo), pues bien en una de estas dos fases ó en ambas se acostumbran a llevar a cabo las determinaciones analíticas.

Con el advenimiento de la penicilina se extendió extraordinariamente el empleo de los cultivos sumergidos en la metodo-

legía de hongos, de manera que en la actualidad los cultivos sembrados se han seguido también en el estudio de la autólisis.

En la actualidad los métodos seguidos para el estudio de la autólisis en los hongos filamentosos se efectúan de acuerdo con una de las técnicas que siguen:

- a) Cultivo estacionario con la consiguiente toma de muestra directa en diversas fases del período de autólisis.
- b) Cultivo estacionario del microorganismo, cosechado del micelio, secado, pulverizado y suspensión del mismo en agua destilada ó en alguna disolución acuosa generalmente diluida de ciertas sustancias químicas. Estudio de éste líquido considerado como el autólisis.
- c) Cultivo sumergido del que periódicamente se retira una muestra del inubador, una vez que el cultivo ha entrado en la fase de autólisis.

Siguiendo la técnica descrita en el a) se han efectuado los estudios objeto de la presente investigación.

Por el procedimiento de trabajo descrito en b) E. Enri-

Liani y Ueha de Davis (1.962) (17) estudian la autólisis del micelio del Aspergillus phoenicis. Para ello cultiva este microorganismo en cultivo estacionario en un medio nutritivo cuya fuente carbonada es la sacarosa en cantidad de 100 gr./lt. y sales minerales. Efectuaban el cultivo sobre cantidades de 50 ml. del citado medio contenidas en matraces erlenmeyer de 250 ml. El pH inicial del medio era de 4,5 el cual rápidamente descendía al valor 1,0 debido a que el medio contiene cierta cantidad de ClNH_4 .

En estas condiciones obtenían en dos días una consistente capa de micelio, cuyo peso seco era muy pronto de 1 gr. cada matraz.

Al quinto día de incubación ya había desaparecido todo el azúcar inicial del medio.

En este punto es donde los autores comienzan el estudio de la autólisis propiamente dicha. A ésta autólisis la llaman inducida y la efectúan del modo siguiente: Separan el micelio del líquido de cultivo y lavan aquel con agua suspendiéndolo a continuación en soluciones de ácido acético 0,2 M de diferentes pH a 30° C. durante 2 ó 4 días. Por cada gramo de micelio se

se empleaban 50 ml. de solución ácida.

Al cabo de este tiempo toman el líquido amarillento (autólisis) que se forma por paso y subsiguiente disolución de materiales celulares en la solución de ácido acético.

Siendo la glucosa uno de los materiales, que en mayor cantidad encuentran estos investigadores en el autólisis orientan su atención principalmente en el estudio del efecto del pH, temperatura, edad del cultivo, etc. en la formación de glucosa.

Los autores concluyen exponiendo que las células de este microorganismo pierden una cierta cantidad de sustancias, que ya existen formadas en la célula y otras que se forman durante la autólisis. Ambas clases de sustancias pasan a la solución de ácido acético. En 3 días el micelio perdió un 50% de su peso inicial.

Finalmente, de la manera descrita en c) estudian Tandon y Chandra (1.962) (44) la autólisis del Colletotrichum gloeosporioides. Este estudio junto con el anteriormente citado, constituyen dos de los más completos de estos últimos años

Los autores cultivaron el microorganismo citado en un

medio analogo al de Czapek-Dox, contenido en matraces erlenmeyer de 250 ml. y los sometian a un movimiento enérgico en un agitador rotatorio a 25° C. En estas condiciones la fase de autólisis comenzaba a los 15 días de edad de los cultivos. El micelio lo cosechaban en días alternos una vez iniciada la autólisis. En el filtrado de cada muestra determinaban amino-ácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos. El micelio lo secaban a 65°C. lo pulverizaban y extraían con diversos disolventes. En los extractos obtenidos determinaban amino-ácidos, azúcares y ácidos orgánicos.

A medida que la autólisis avanzaba observaban una pérdida en el peso de micelio. Durante los estados iniciales de la autólisis, la pérdida de peso era rápida, pero decrecía gradualmente de manera que al final se hacía despreciable.

Los autores concluyen, que durante la fase de autólisis las proteínas contenidas en el micelio del Colletotrichum gloeosporioides se degradan lo cual viene indicado por la aparición de amino-ácidos en el medio.

Los resultados indicaban también que había una gran concentración de sacarosa, maltosa y otros dos oligosacaridos en el

micelio al comienzo de la autólisis. A medida que avanzaba la misma su concentración decrecía indicando su destrucción. Los productos de degradación de aquellos, o sea, los monosacáridos eran detectados en el micelio hasta un cierto tiempo transcurrido el cual desaparecían.

MATERIALES Y METODOS.

El método seguido para el estudio de la variación en la composición química del micelio del Aspergillus terreus, durante un largo período de incubación, fué el método de cultivo estacionario. La razón de cultivarlo durante un largo período de tiempo, fué que con ello se lograba entrar ampliamente en la fase autolítica del crecimiento, que es a la que se ha dedicado la mayor atención y que constituye el objeto primordial de esta investigación.

El medio de cultivo empleado para crecer este microorganismo fué el medio de Caspary-Dox. Este es químicamente definido, simple y fácilmente reproducible en el que existe una fuerte carga única. La fuente nitrogenada también única es inorgánica y como se ve (pag. 58) en forma de nitrógeno nítrico.

En este medio la fuente carbonada (glucosa), va en una concentración del 5%. El tomar el nitrógeno en forma de NO_3^- nos da un medio fisiológicamente básico, en el cual la autólisis se efectúa con mayor extensión. Esto nos crea unas condiciones más favorables para el estudio del fenómeno. (autólisis).

El cultivo se efectuó en matraces erlenmeyer de 300 ml. de capacidad conteniendo cada uno 100 ml. del citado medio. En el experimento que sirvió de base para esta investigación, se sembraron 70 matraces.

De esta manera se conseguía una buena relación superficie volumen, factor éste, como se sabe tan importante en los cultivos de superficie.

La incubación se efectuó a la temperatura de 24 - 25° C. y en la oscuridad, condiciones éstas, que como es sabido son óptimas para el desarrollo de estos microorganismos.

El tiempo máximo de incubación fué de 30 días. Periódicamente se retiraban muestras de la estufa de incubación para ser analizadas. Cada muestra consistía en 5 matraces cuyo contenido se mesolaba, separándose a continuación el micelio del líquido de cultivo por filtración.

Estas muestras se tomaban en principio cada 6 días, comenzando a los 12, 18 24 y 30 días de incubación. A los 30 días de incubación se comenzaban a observar signos inconfundibles de haber empezado la fase de autólisis, tales como oscurecimiento del líquido de cultivo, cambio brusco del pH del medio etc.

Ya que de un pH de 4,6 en la muestra anterior pasaba a ser en ésta un pH de 8,0. El peso máximo de micelio seco resultante se obtuvo a los 30 días de incubación, la muestra retirada a los 36 días de cultivo dió un micelio que seco pasaba menos que la muestra anterior. Lo que confirmaba nuestra sospecha de que la fase de autólisis se había iniciado a los 30 días.

A partir de este tiempo (30 días), se continuaron tomando muestras cada 6 días, si bien únicamente se determinaba en ellas el peso de micelio seco y el pH del líquido de cultivo.

Las determinaciones analíticas restantes se efectuaron solamente en muestras separadas entre sí, por un período de incubación de 12 días, con lo que la diferencia en la composición química de las mismas era mayor y por tanto se hacía más notoria en las determinaciones analíticas.

En experimentos previos se comenzó analizando muestras que habían sido tomadas con una diferencia en el tiempo de incubación de 6 días solamente, y se observaba que los datos obtenidos para las diferencias en el contenido grasa, carbohidratos y manitol, entre dos muestras consecutivas eran tan pequeñas que se hacía difícil su interpretación. Esto nos condujo a analizar únicamente

las muestras cuyo período de incubación difiere entre sí como mínimo 12 días.

En todos los casos el micelio era separado del líquido de cultivo, lavado, desecado, cuidadosamente pulverizado y así quedaba preparado para las determinaciones analíticas.

En el líquido de cultivo únicamente se determinaba el pH y el azúcar residual (glucosa).

En cada una de estas muestras se hacían las determinaciones siguientes:

- 1.- Determinación gravimétrica de la grasa (fracción I.).
- 2.- Determinación gravimétrica del extracto etéreo (fracción II.).
- 3.- Determinación cualitativa y cuantitativa de azúcares libres.
- 4.- Determinación cualitativa y cuantitativa de azúcares alcoholes.
- 5.- Determinación cuantitativa de Mg. y P. en el micelio.

El micelio de las diferentes muestras se extraía en un Soxhlet primeramente con eter de petróleo, y a continuación con eter sulfúrico. El material obtenido en la primera extracción (eter de petróleo), era una grasa líquida a la temperatura ordinaria (aceite), cuya cantidad una vez evaporado el disolvente se determinó por pesada, obteniéndose así la fracción I.

A continuación se extraía el micelio con eter sulfúrico como se dice anteriormente y de ésta manera se obtenía un material intensamente coloreado de rojo oscuro, uno de cuyos componentes parecía ser alguna substancia de naturaleza fenólica ya que con solución de Cl_3Fe . producía una intensa coloración verde oscuro, la variación cuantitativa total de esta fracción II se determinó por pesada.

El residuo seco del micelio una vez extraído por disolventes orgánicos, se extraía por agua y en éste extracto acuoso se caracterizaron cromatográficamente la glucosa, xilosa, maltosa y manitol.

La determinación cuantitativa total de azúcares reductores se llevó a cabo por el método de Somogyi, y la determinación cuantitativa de manitol se efectuó midiendo con un densitómetro

la intensidad de la mancha producida en el cromatograma por una cantidad determinada de líquido problema.

En la determinación del fósforo existente en el micelio se siguió una adaptación del método de Fiske y Subbarow., y la determinación del magnesio fué hecha por el método de Gerold Schwarzenbach

METODO DE SONOGYI PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.

Este método se basa en la oxidación de azúcares por compuestos cúpricos en solución alcalina. Fue seleccionado porque reúne las siguientes ventajas:

1º.- Es suficientemente alcalino para la determinación.

de maltosa y otros azúcares de pequeña reactividad.

2º.- El reactivo es estable.

3º.- Puede usarse entre límites muy amplios 0,01 mgr.

hasta 3,0 mgrs. de glucosa ó otros azúcares de equivalentes poder reductor.

4º.- Por ser muy usado en análisis de materiales biológicos.

REACTIVOS.

a) Reactivo alcalino de cobre Sonogyi (1.945) (43).

Constituyentes del Reactivo:

Un litro de solución contiene:

40 gra. de sal de la Rochelle.

71 grs. de fosfato disódico dodecahidrato (6
53 grs. del heptahidrato).

100 ml. de NaOH N.

8,0 grs. de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

0,892 gr. de IO_3K .

180 grs. SO_4Na_2 anhidro.

Preparación:

40 grs. de sal de la Rochelle, 71 grs. de fosfato disódico dodecahidrato y 100 ml. de NaOH N. se disuelven en 500 ml. de agua. A ésta mezcla se añaden 80 ml. de una solución conteniendo 8,0 grs. de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, seguidos de una solución de 0,892 gr. de iodato potásico en 100 ml. de agua. Finalmente se agregan 180 grs. de sulfato sódico anhidro; la solución se diluye a un litro y se deja durante 3 días de manera que se depositen las impurezas. La solución clara se decanta y el resto se filtra. El pH es 9,5 aproximadamente. La solución es estable por lo menos un año.

b) Yoduro potásico 2,5% para usarlo con el reactivo de

1.945.

Una solución de 2,5 gra. de yoduro potásico en 10 ml. de agua se hace alcalina con carbonato sódico ó hidróxido sódico. Esta solución deberá permanecer incolora cuando se acidifique y se trate con una gota de almidón como indicador.

c) Tiosulfato sódico 0,005 N.

Se prepara en el momento de usarlo a partir de una solución madre de tiosulfato sódico 0,1 N. Se toman 25 ml. de tiosulfato sódico con pipeta y se llevan a un frasco volumétrico de 500 ml. diluyendo hasta la marca con agua hervida.

d) Almidón indicador.

Se prepara una solución al 1% con almidón soluble. Se agrega el almidón al agua hirviendo.

Procedimiento:

Si la muestra es ácida ó muy alcalina debe neutralizarse a pH 8, empleando como indicador fenolftaleína.

Se pone la muestra en un tubo de ensayo de 25 x 200 mm. y la muestra es llevada a 5 ml. con agua. Se añaden con una pi-

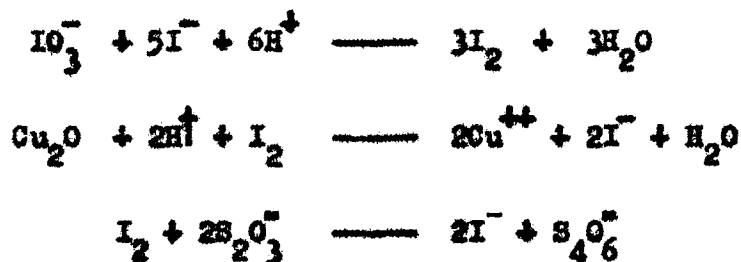
peta 5 ml. del reactivo alcalino de cobre y mescla completamente. Se oierra el tubo con un bulbo de vidrio y coloca en una gradilla. Se preparan ensayos en blanco por duplicado conteniendo 5 ml. de agua y 5 ml. del reactivo de cobre alcalino, generalmente se preparan también soluciones de azúcar patrón apropiadas. La gradilla con los tubos se sumerge en un baño de agua hirviendo vigorosamente, con una diferencia de nivel de unos 5 cm. dentro y fuera de los tubos. Con el reactivo 3.945, se tiene hirviendo durante 10 minutos para determinar glucosa, 6 fructosa; 20 minutos para arabinosa, galactosa, 6 maltosa y 30 minutos para manosa, lactosa y polisacáridos. Terminado el período de calentamiento la gradilla se coloca durante unos 3 minutos en un baño de agua fría, para que su temperatura llegue a ser de unos 25 á 30°. Los tubos no deberán ser agitados durante los periodos de calentamiento y enfriamiento.

A continuación se añaden a cada tubo 2 ml. de IK al 2,5% sin que se mesclen. Después con una bureta de vertido rápido se añade a cada tubo 1,5 ml. de SO_4H_2 2N., a la vez que se agita de manera que el yodo liberado oxidará todo el cobre reducido. Después de 5 minutos, se vuelven a agitar los tubos. El exceso

de yodo liberado y no reducido por los iones cuprosos se valora con tiosulfato 0,005 N., usándose almidón como indicador.

Los blancos requieren alrededor de 25 ml. de tiosulfato 0,005 N, cuando el reactivo alcalino de cobre contiene 0,892 gr. de IO_3^- . ó 25 ml. de solución de IO_3^- N. por litro. La diferencia entre el blanco y la muestra es equivalente al cobre reducido por el azúcar. Valorando soluciones de azúcar patrón a tres ó más concentraciones en el rango en que se trabaja se obtiene una relación lineal entre mgr. de azúcar y ml. de tiosulfato 0,005 N, gastados. Usando la inclinación de esta línea como el factor mgr. de azúcar por ml. de tiosulfato de 0,005 N, puede calcularse la cantidad de azúcar en el líquido problema.

Ecuaciones.



Limitaciones:

Los cloratos y nitratos, citratos y oxalatos, las sales

de hierro, calcio y magnesio, así como los precipitados suspendidos en la muestra pueden reducir bastante los valores normales. El cloroformo y fenól pueden descomponerse y probablemente interferir en la valoración.

Si el alcohol está presente hay que hacer un blanco que tenga la misma cantidad de éste.

Curva patrón Somogyi.

Se preparó una disolución que contenía 0,343 mgr. de glucosa y 0,165 mgr. de xilosa por ml. De aquí se tomaron muestras para hacer la curva patrón.

Se preparó otra disolución conteniendo 0,343 mgr. de glucosa, 0,165 mgr. de xilosa y 0,192 mgr. de manitol por ml. No hubo variación en los resultados obtenidos con muestras iguales de ambas disoluciones. Con lo cual se trataba de confirmar la no interferencia del manitol de acuerdo con la teoría, por no ser este reductor.

Volumen.	Conc. Azúcares.	ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$
1 ml.	0,508 mgr.	3,9 ml.
2 "	1,016 "	7,6 "
3 "	1,524 "	11,1 "

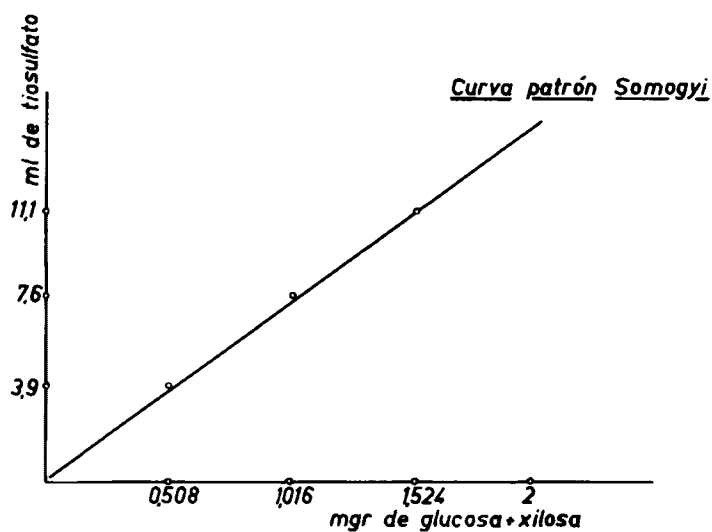


Fig. 1.- Curva patrón para determinación de azúcares reductores totales por el método de Somogyi.

CRONATOGRAPHIA DE AZÚCARES.

El moderno concepto sobre cromatografía de papel fue primeramente descrito por Consden, Gordon y Martin (10), para separación de mezclas complejas de amino-ácidos. En 1.947, Partridge (32) demostró la eficacia y utilidad de este método en el análisis de azúcares. Mezclas de monosacáridos, esteroides, sales como glicocosa y glucosa, xilosa y arabinosa y ramnosa y fructosa puedan ser separados por cromatografía sobre papel. En uno de los mejores métodos de microanálisis de azúcares.

Para la cromatografía de azúcares es muy importante la elección de disolvente, siendo un factor crítico el contenido de agua, puesto que la solubilidad de un azúcar en la fase móvil define su movimiento sobre el cromatograma y por tanto afecta al grado de separación de una mezcla de azúcares.

Para caracterizar un azúcar hay que determinar su Rf, que es la razón de las distancias recorridas por la sustancia y el frente líquido (disolvente), desde el punto de aplicación.

Otro método de determinación de azúcares, que en la práctica resulta muy sencillo, consiste en comparar el camino reco-

rrido por la sustancia problema con el camino recorrido por distintos asfoares conocidos, puestos en las mismas condiciones (patrones).

Para conseguir una mejor separación de la mezcla de asfoares se usa el método del múltiple desarrollo. Una vez que la mezcla ha sido separada por el disolvente y el papel se ha secado, se vuelve a meter en la cámara de cromatografía y pasa nuevamente el disolvente a través del papel. Jeannes (24) determinó que después de dos desarrollos se efectuaba una excelente resolución de una mezcla de asfoares simples.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

- a) Papel usado.- Papel de filtro Whatman n° 1.
- b) Preparación de la muestra.-

La precipitación de proteínas y otros contaminantes fué llevada a cabo por el método descrito por M. Eastham (15) : 100 ml. de líquido biológico se trataban con 1 ml. de acetato básico de plomo; el precipitado formado era separado por filtración. Del fil-

trado se hizo directamente la cromatografía ya que la baja concentración salina de la disolución de azúcares no interfería en ésta.

c) Aplicación de la muestra sobre el papel.

El papel de filtro Whatman n° 1, se corta en tiras de 24 x 25 cm. El líquido problema se colocaba a una distancia de 5 cm. del borde del papel y equidistando entre ellas, así como de los bordes laterales 4 cm. Se aplicaba el líquido al papel con pipetas de 100 microlitros.

d) Disolvente.

El disolvente usado fué:

Butanol: Ácido acético: Agua, en la proporción siguiente:

40: 10: 22 v/v.

Este disolvente es recomendado por Block, Durrum y Zweig, (5) en su obra "Paper chromatography and Electrophoresis".

e) Técnica seguida.

Cromatografía descendente.

La cámara cromatográfica estaba a una temperatura constante de 20° C.

La separación de los azúcares se consiguió en 48 horas metiendo las cromatografías 16 horas durante tres días consecutivos.

f) Detección de azúcares.

Se siguió el método recomendado por Trevelyan (1.950) (46), y Petronici (1.953), (33).

Reactivo.

Preparación del reactivo:

0,1 ml. de solución saturada de nitrato de plata se agrega a 20 ml. de acetona, precipitando el nitrato de plata. A continuación, se agrega agua gota a gota, hasta redisolución del precipitado formado. Se guarda en frasco tapado.

Revelador.

El papel se pulveriza con una solución 0,5 N.

de NaOH en etanol anhidro (Se empleó etanol de 96%)

Los azúcares reductores forman manchas marrones a la temperatura ambiente.

Revelador.

Primariamente se siguió la técnica del tiosulfato de Benson (1.952) (4).

El exceso de Ag_2O se quita introduciendo el cromatograma seco en una disolución de tiosulfato al 1%, durante unos minutos. Después se lava con agua. Nosotras optamos por seguir el método dado por Roy L. Whistler y M.L. Wolfrom (51) en la obra "Carbohydrate Chemistry". Después de 10 minutos de haber sido pulverizado el cromatograma con el revelador, se introduce este en hidróxido amónico 6 N. durante 5 minutos. Finalmente es lavado con agua y secado.

g) Determinación cuantitativa del manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las man

chas en un densitómetro Elphor.

La cantidad de líquido colocado sobre el papel para obtener la mancha fué de 0,1 ml., se iba poniendo sobre el mismo de 10 microlitros en 10 microlitros, y cada vez se secaba con aire caliente.

Se hizo con objeto de que el diámetro de las manchas fuese homogéneo y se muy grande. Después se siguió la técnica cromatográfica ya descrita. Finalmente las manchas eran cortadas en tiras de tamaño conveniente, para colocar en la escala del densitómetro. La transparencia se conseguía introduciendo dichas bandas en parafina líquida ó en glicerina. Con la banda dentro del aparato éste se ajustaba a cero. El cursor se movía a mano, cada milímetro que avanzaba este, daba lugar a una variación de intensidad que era llevada sobre papel milimetrado, obteniéndose una curva reproducible. La lectura se hacía de izquierda a derecha y de derecha a izquierda. La superficie de la curva fué medida con un planímetro manual.

Curva patrón. Densitómetro.

Se preparó una disolución que contenía 0,192 mgr. de manitol por ml.

<u>Volumen.</u>	<u>Conc. Manitol.</u>	<u>Superficie.</u>
0,05 ml.	9,6 γ	190 mm ² .
0,102 "	19,6 "	360 "
0,204 "	39,2 "	720 "

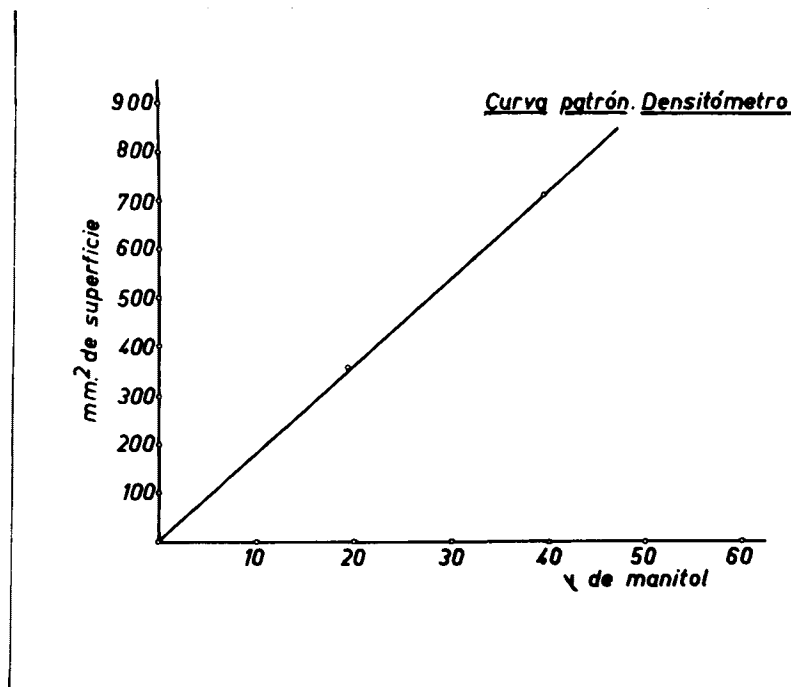


Fig. 2.- Curva patrón para determinación del manitol por densitometría.

METODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL FÓSFORO.

(Adaptación del método de Fiske y Subbarow. (19).)

Para esta determinación se necesitan las soluciones de los reactivos siguientes:

- 1º.- Molibdato amónico al 2,5% en ácido sulfúrico 5 N. (136 ml. de SO_4H_2 o. se mezclan con 350 ml. de agua. Después de enfriarlo se agregan 25 gr de molibdato amónico y se completa el volumen a 1 litro).
- 2º.- Molibdato amónico al 2,5% en agua.
- 3º.- Ácido sulfúrico 5 N. (864 ml. de agua más 136 ml. de SO_4H_2 o.)
- 4º.- Ácido sulfúrico 1 N.
- 5º.- Reactivo amino naftol-sulfónico 8 diclonógeno.

Se pesan:

29 gr. de SO_4HNa .

1 gr. de SO_3Na_2 .

0,5 gr. de ácido 1, 2, 4 aminonaftol-Sul

fónico (Photovolt Co N.e.) Este se tritura en un mortero.

Estos reactivos se disuelven en 200 ml. de agua destilada procediéndose así:

Se disuelve el bisulfito en la mayor parte de agua, después aparte en un poco de agua se disuelve el sulfito. A continuación el ciconógeno se disuelve sobre el volumen de bisulfito y para que se disuelva bien se va añadiendo poco a poco la solución de sulfito.

Una vez mezclados bien, se filtra y guarda en nevera, siendo estable durante un cierto tiempo, desde luego variable. Con el frío suele producirse la cristalización de parte del sulfito, puede ser usado sin inconveniente.

6º.- Patrón de fósforo.

Se disuelve en agua 0,1361 gr. de fosfato monopotásico, se agregan 20 ml. de SO_4H_2 5N y completa el volumen a 1 litro; resulta la solución 0,001 M. (1 mg. orosol/ml.)

Procedimiento.

Se utilizaron tubos de ensayo aferados a 10 ml.

déspués de mezclar los reactivos y completar volúmenes aparece un color azul que aumenta con el tiempo. En el método original se deja reposar a la temperatura ambiente de 15 á 20 minutos, teniendo en cuenta que los cambios de coloración son muy lentos después de los primeros 10 minutos. Nosotros hemos preferido incubar las mezclas a 30° C., con lo que la formación de color es más rápida y regular. A los 20 minutos el color está en la zona más estable y por tanto más adecuada para hacer las lecturas.

Este método es válido entre amplios límites (0,1 á 4,0 micromoles, siendo la zona mejor para una valoración perfecta de 0,5 á 1,5 micromoles.). El desarrollo de color es lineal hasta, 5 micromoles, pero se sale de la escala del fotómetro.

Existen las siguientes posibilidades.

1º.- Determinación del fósforo inorgánico.

Sobre el problema en unos 5 ml. (volumen no crítico) se añade 1 ml. de molibdato ácido; 0,5 ml. de cinénogeno y se completa a 10 ml. con agua. A los 20 minutos de incubación a 30° C., se lee en el fotómetro de Klett-Summerson, con el filtro rojo (nº66).

2º.- Determinación del fósforo lábil.

El problema, en un volumen menor de 0,5 ml., se trata con 5 ml. de SO_4H_2 1 N.; si el volumen es mayor se completa a 4 ml. y se añade 1 ml. de SO_4H_2 5 N. Se mantiene en baño hirviente durante un tiempo apropiado (normalmente 11 minutos) y después de enfriar se valora como el fósforo inorgánico.

3º.- Determinación del fósforo total.

El problema, en el menor volumen posible, se calienta hasta carbonización en presencia de 1 ml. de SO_4H_2 5N. El calentamiento debe hacerse en presencia de algún pequeño trocito de porcelana porosa. El fin de la reacción viene dado por el desprendimiento de vapores característicos de SO_3 (blancos). Una vez frío el tubo, y rasbalando por las paredes se añade una gota de NO_3H , concentrado, que oxida la materia orgánica y libera CO_2 , decolorándolo. En caso de que la materia orgánica fuera muy abundante, será necesario el empleo de 1 ó 2 gotas más de

HNO_3 . Cuando terminan de desprenderse los vapores del HNO_3 , se vuelven a desprender los blancos del SO_4H_2 . A continuación se enfría el tubo ligeramente, y se añaden 5 ml., de agua destilada, teniendo se unos 10 minutos en baño hirviente para hidrolizar el pirofosfato.

Después de enfriarlo se determina el fósforo según la pauta habitual.

4º.- Determinación del fósforo orgánico no nucleotídico.

Se determina por diferencia entre fósforo inorgánico y el fósforo total, hecho éste después de eliminar los nucleótidos, mediante ácido tricloroacético al 5%, y exceso de carbón activo (éste en la proporción de 25 - 50 mgr. por uno de nucleótido, se agita y filtra. El carbón tiene que estar libre de fósforo.). Eventualmente puede resultar necesario un control de fósforo lábil. La acidez final debe ser de 0,5 N, sin exceder nunca de 0,7 N. Los patrones y blancos se hacen simultáneamente.

Curva patrón de fósforo.

Concentraciones de fósforo. Lecturas en unidades Klett.

77,35 γ	500,0 u.K.
51,49 γ	367,5 u.K.
38,61 γ	262,0 u.K.
30,89 γ	216,0 u.K.
15,44 γ	95,0 u.K.
7,72 γ	49,0 u.K.
3,86 γ	15,0 u.K.

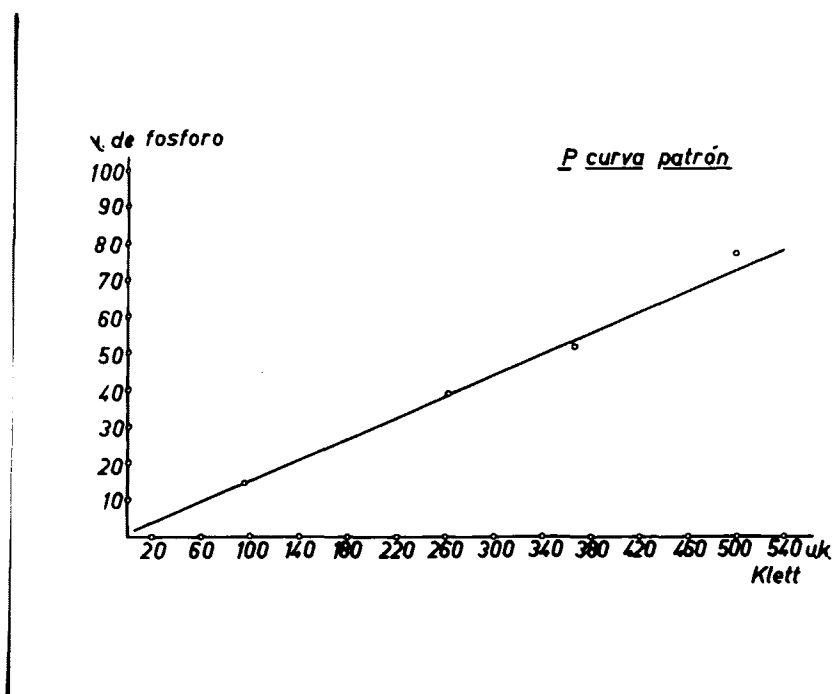


Fig. 3.- Curva patrón para la determinación del fósforo por el método de Fiske y Subbarow.

DETERMINACION VOLUMETRICA DEL Mg. POR COMPLEXOMETRIA.

Método de Gerold Schwarzenbach. (40).

Para éste método es necesario preparar los reactivos siguientes:

1º.- Solución de E.D.T.A. (etilen diamino tetraacético). N. Se pesan 3,721 gr. de E.D.T.A. desecado en estufa a 60° C., y frío se disuelve en 1 litro de agua (Se emplea la sal disódica).

Referencia: Sal disódica del ácido etilen diaminotetraacético.

2º.- Cianuro potásico. 1 gr. en 1.000 ml. de agua. El CN^- se emplea para enmascarar el Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg y metales del grupo de Pb.

3º.- Solución tampón. Se disuelve 67,5 gr. de $ClNH_4$ en 200 ml. de agua destilada, se añade 570 ml. de NH_3 concentrado y puro. Diluir a 1000 ml. de agua (pH = 10).

4º.- Indicador negro de eriocromo T. Se pesan 0,2 gr. de negro de eriocromo T y 2 gr. de clorhidrato

de hidroxilamina (Este se utiliza como reductor, para evitar que el eriocromo se oxide) y se disu~~el~~ven en 50 ml. de alcohol metílico.

Comprobación de la solución de E.D.T.A. Se toman 10 ml. de una solución que tenga 100 p.p.m. de Mg. y se valoran con la solución de E.D.T.A. preparada.

METODO OPERATORIO.-

En el caso que exista calcio habrá que eliminarlo pues interfiere. (Ver bibliografía n° 40.) Este nunca puede ser nuestro caso, ya que inicialmente el medio de cultivo no contig~~ne~~ne ese elemento.

Si hay Fe, hay que eliminarlo, pues incluso en forma coloidal en la solución interfiere, aunque se halle presente en cantidades mínimas pudiendo hacerse inocuo por adición de SnCl_2 , (Deberá hacerse a un pH = 7). Cuando hay fosfatos presentes, habrá de valorarse muy rápidamente a continuación de la alcalinización. Grandes cantidades de fosfatos interfieren.

Digestión del problema.

El problema, en el menor volumen posible, se calienta

hasta total carbonización en presencia de 1 ml. de SO_4H_2 5 N. El calentamiento se hace en presencia de algún pequeño trocito de porcelana porosa. El fin de la reacción viene dado por el desprendimiento de vapores característicos de SO_3 (blancos). Una vez frío el tubo, resbalando por las paredes se añade una gota de NO_3H concentrado, el cual oxida la materia orgánica y libera CO_2 decolorándolo. En el caso de que la materia orgánica fuera muy abundante será necesario el empleo de 1 ó 2 gotas de NO_3H . Cuando terminan de desprenderse los vapores rojos se vuelven a desprender los blancos de SO_4H_2 .

Este volumen final se llevó a 10 ml. De aquí, se toman muestras para determinación del Mg. estas se neutralizan a pH de 7 - 8, con NaOH ; después su volumen se completa a 10 ml. con agua (matraz aforado). A continuación se añaden 2 ml. de solución tampón, 2 ml. de CHK y 5 gotas de negro de eriochrome T, y se valora con la solución de E.D.T.A. Debido a la sensibilidad del método hay que tener cuidado de hacer las determinaciones con volúmenes iguales. Añadir la cantidad exacta de solución tampón, de CHK y de agua destilada. Agregar el tampón antes del indicador.

Comprobación de la solución E.D.T.A.

100 ml. de la solución preparada de E.D.T.A., son llevados a 1.000 ml. ó sea dilución a la décima.

<u>Vol.sol.Mg.</u> <u>Patrón.</u>	<u>Cono.Mg.co-</u> <u>respondiente.</u>	<u>Ml.de E.D.T.</u> <u>A.gastado.</u>	<u>E.D.T.A./ml.</u>	<u>Media.</u>
0,5 ml.	0,05 mgr.	2,3 ml.	4,60 ml.	
1,0 "	0,10 "	4,5 "	4,50 "	
1,5 "	0,15 "	6,8 "	4,53 "	
2,0 "	0,20 "	8,8 "	4,40 "	4,5 ml.
2,5 "	0,25 "	11,4 "	4,56 "	
3,0 "	0,30 "	13,4 "	4,46 "	

0,1 mgr. de Mg.....l. 100 γ 4,5 ml. de E.D.T.A.

x γ 1 ml. de E.D.T.A.

x = 22,22 γ de Mg. por 1 ml. de E.D.T.A.

Cada vez hay que valorar la solución de E.D.T.A. por lo cual conviene hacer todas las determinaciones seguidas.

CARACTERISTICAS DEL ASPERGILLUS TERREUS.

Thom y Raper en su obra "A manual of the Aspergilli", (1.945) pag. 195 (45), hacen la descripción siguiente del que llaman "The Aspergillus terreus Group" y describe este microorganismo con los:

Caracteres principales.

"Cabezuelas columnares, de color canela, amarillo pálido o carne. Conidióforos lisos, incoloros los cuales superan raramente de 250μ . Vesículas hemisféricas, con la mitad superior cubierta con esterignata. Esterignata en dos series, generalmente compactas. Conidios lisos, esféricos o ligeramente elípticos y pequeños.

Las colonias sobre Czapek-agar crecen bien a la temperatura del laboratorio hasta $37^{\circ}\text{C}.$, extendiéndose planas o bien con surcos radiales aterciopelados. En algunas cepas se aprecia cierta tendencia a convertirse en floccosas en las zonas centrales de la colonia. Abundante esporulación en toda la superficie con grandes masas de cabezuelas columnares las cuales dan a la colonia su color característico y textura. El color canela

varía de tonalidad, dependiendo de la abundancia y madurez de las cabezuelas. Algunas cepas producen un exudado de color anbarino. Ligero olor, a veces inexistente. El tono de color del reverso varía desde el amarillo mate al amarillo-marrón y marrón. Conidios en cadena muy juntos y compactos y con diámetro uniforme en toda su longitud. Cuando están maduros su tamaño va desde 150μ a 500μ por 30 a 50μ . Los conidióforos más o menos flexuosos, lisos e incoloros y cuyo tamaño va desde 100 a 250μ por $4,5$ a $6,0 \mu$ aproximadamente uniforme en profundidad. Vagículos hemisféricos de forma de cúpula normalmente de 10 a 16μ de diámetro, hundido casi imperceptiblemente en los conidióforos que los soportan. Los esterigmas en dos series, las primeras apinadas y paralelas de $5,0$ a $7,0 \mu$ por $2,0$ a $2,5 \mu$, las secundarias estrechamente apinadas y empaquetadas de $5,5$ a $7,5 \mu$ por $1,5$ a $2,0 \mu$. Los conidios esféricos y a veces ligeramente elípticos, normalmente de $1,8$ a $2,4 \mu$ de diámetro.

La especie es muy abundante en suelos cálidos y en tierras de labor. La gran mayoría de las cepas aisladas pertenecientes a estas series caen dentro del Asp. terreus, en el más estricto sentido y responden esencialmente en todos los caracteres

particulares a la descripción dada anteriormente para esta especie. Sin embargo se encuentra una amplia variación natural entre las diferentes copas, siempre que se aislan un gran número de ellas, especialmente cuando proceden de lugares muy alejados.

P A R T E E X P E R I M E N T A L.

Preparación de inóculos.

El microorganismo empleado en este trabajo, una cepa de Aspergillus terreus que se halla depositada en la colección de microorganismo del Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán" del C.S.I.C., figura en el catálogo de ésta colección con el n° 2.426 . Fue aislado de una muestra de tierra de labor procedente de Villafranca de los Barros (Badajoz), que nos fue facilitada por el Instituto de Edafología del C.S.I.C.

Sus características morfológicas, han sido expuestas en la pag. 52, de acuerdo con la descripción que de estas especies hace Thom y Raper, en su obra "Manual of the Aspergilli". (45).

La suspensión de esporas que sirvió de inóculo en éste trabajo fue preparada a partir de cultivos del citado organismo en agar-malta. Para ello se sembró en estría de acuerdo con las técnicas microbiológicas, un tubo inclinado de agar-malta, con el cultivo de la colección citado. Se incubó durante 15 días a 24° centígrados, en la oscuridad. Transcurrido

este tiempo el cultivo se hallaba abundantemente esporulado y a partir de él se obtuvieron, siguiendo el procedimiento de siembra que acaba de describirse, ocho cultivos también en agar-malta los cuales se incubaron a 24° C., durante 15 días en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se retiraron los cultivos de la estufa de incubación.

Los tubos contenidos en su gradilla se colocaron en la vitrina de siembra y esterilmente se vertió en cada uno de los tubos 10 ml. de agua destilada esteril. A continuación se raspó suavemente la superficie de cada uno de los cultivos, utilizando para ello una espátula esteril de acero inoxidable, una de cuyas caras es estriada. Se tomó por medio de una pipeta esteril, los 10 ml. de suspensión de esporas formada en cada uno de los tubos y se reunieron en un matras enlarmeyer esteril de 500 ml. de capacidad. De esta manera se obtuvieron 80 ml. de suspensión de esporas de Aspergillus terreus. Se agitó el matras imprimiéndole un fuerte movimiento de rotación, y así se consiguió una suspensión lo suficientemente homogénea, para inocular el medio sin dificultad.

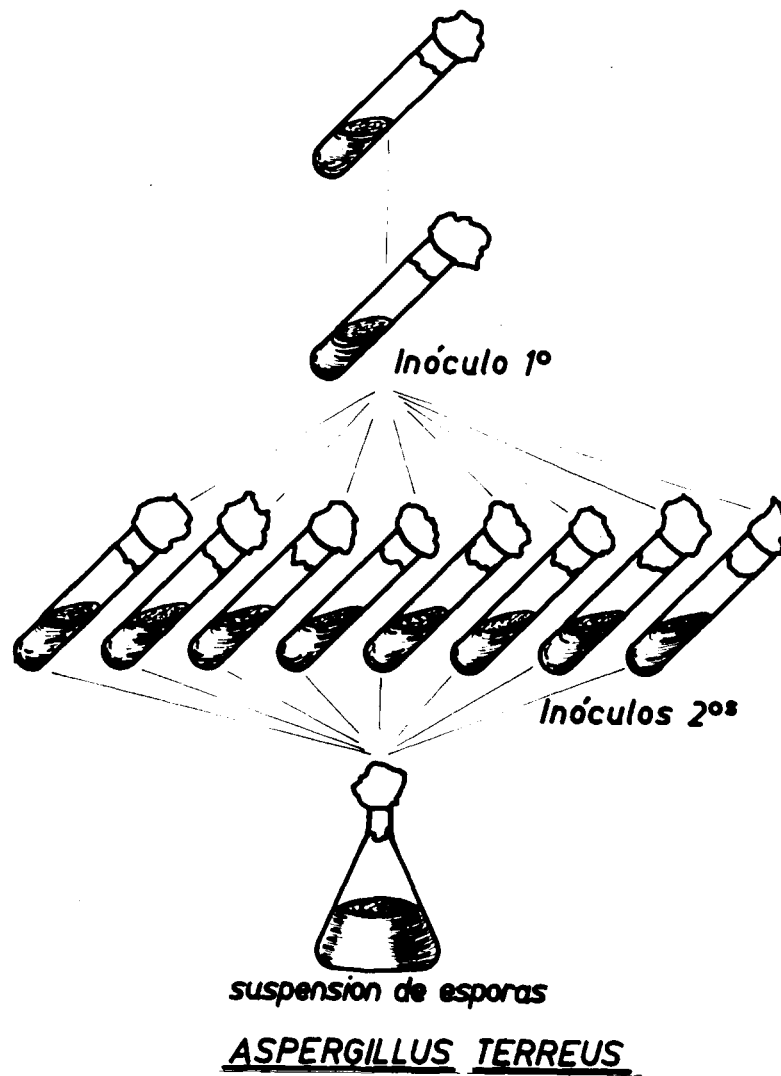


Fig. 4.- Manera de preparar la suspensión de esporas para inocular los matraces.

Preparación del medio, distribución en matraces, esterilización
del mismo e incubación.

Se prepararon 7,0 litros del medio de Caspary-Dox, de la
composición siguientes:

Glucosa	50,0 gr./l.
Na_2HPO_4	2,0 "
CHK.	0,5 "
KH_2PO_4	1,0 "
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 "
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01 "
Agua destilada a	1.000 ml.

Se procedió así:

Se disolvieron todas las sales excepto el fosfato, en
500 ml. de agua destilada, después, se agregó la glucosa y a con-
tinuación el fosfato que previamente se había disuelto en 100 ml.
de agua. Se agitó la mezcla y completó a un litro con agua des-
tilada (Se prepararon 7 litros).

Para evitar la precipitación de fosfato magnésico se empleó en la preparación de este medio $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, en lugar del PO_4HK_2 que es el que figura en la fórmula original de Caspary-Dox, según las indicaciones dadas por G. Smith (42), en su libro titulado "An Introduction to Industrial Mycology". El medio así preparado tiene un pH = 4,2. No obstante después de la esterilización aparece algo de turbidez.

Una vez preparados los siete litros de medio, en la forma que se acaba de indicar, se distribuyeron en matraces erlenmeyer de "Jena", de 300 ml. de capacidad, a rasón de 100 ml. de medio en cada matraz, con lo que resultaron un total de setenta y tres matrazes. De esta forma se aseguraba una buena relación superficie/volumen.

Se taparon los matraces con torundas de algodón grueso, cubrieron las bocas con papel y se esterilizaron a vapor fluyente media hora cada día durante tres días consecutivos.

Una vez los matraces a la temperatura del laboratorio se inoculó cada uno de ellos con la suspensión de esporas obtenidas según se describe en la pag. 56, de este trabajo, poniendo en ca

da matras, valiendose de una pipeta esteril, 1 ml. de dicha suspensión.

A cada uno de los matraces, recientemente inoculados, se le imprimía un ligero movimiento de rotación hasta conseguir un reparto uniforme de las esporas en el medio.

Los 70 matraces, así inoculados, se cultivaron en estufa a 25° C. en la oscuridad.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.

Primera muestra.

A los 12 días de edad de los cultivos, se retiró del incubador la primera muestra para su análisis, consistente esta en cinco matraces de los cuales se separaba el micelio del líquido de cultivo por filtración. Los líquidos de cultivo de los cinco matraces de la muestra se reunieron en un solo matras y después de agitar la mezcla convenientemente se determinó el pH de la misma a la temperatura del laboratorio, empleando para ello un pHmetro "Beckman". Se obtuvo un pH = 4,10. En dicho líquido de cultivo se determinó también el azúcar residual (gly

cosa), polarimetricamente, empleando para ello el tubo de 10 ml. y usando luz amarilla de sodio; estas determinaciones fueron hechas en un aparato "Galileo".

El valor obtenido para la glucosa residual fué de 1,5%.

El líquido de cultivo presentaba un color amarillo claro.

El micelio procedente de los cinco matraces, se lavó con agua destilada agregando 200 ml. sobre el embudo donde se hallaba este. A continuación se partió en pequeños fragmentos, los cuales eran colocados en pesasustancias apropiadas y estos en la estufa de desecación a 24° C., durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo se taparon los pesasustancias y colocaron en un desecador, donde se tenían una hora a fin de que adquirieran la temperatura ambiente. A continuación eran pesados en una balanza analítica.

Peso del micelio de ésta primera muestras 4,2456 gr.

Peso medio: 0,8491 gr./ matras.

El micelio se redujo a polvo impalpable, triturándolo en una batidora "Furnix". Para las siguientes operaciones se partió

de 4,2102 gr. cantidad que fué colocada en el interior de un percolador sujeta entre dos capas de algodón hidrófilo para ser sometido a extracción.

a) I Fracción.-

El micelio ya preparado como se explica en el párrafo anterior, se sometió a extracción exhaustivamente con eter de petróleo de p.e. 50 - 70° C.

Para conocer el final de la extracción se separó el matraz colector del percolador y se tomaron en un vidrio de reloj unas gotas del disolvente que baja de la cámara de extracción del aparato, evaporado éste se dió por terminada la extracción cuando no quedaba residuo alguno en el vidrio de reloj. Para esta primera muestra bastaron 20 horas.

El percolador se dejó desconectado y en posición vertical durante 24 horas con el objeto de que se secase el micelio así como el algodón, los cuales estaban impregnados en eter de petróleo. A continuación se colocaba en una estufa a 40° C., durante una hora y finalmente se tenía otra hora aireando el interior con objeto de desalojar los últimos residuos de eter que pu-

dieran quedar. Después de esto el micelio estaba completamente seco para empezar la segunda extracción.

El matras colector del percolador contenía la primera fracción disuelta en éter de petróleo; éste disolvente era destilado sobre baño maría, primeramente a la presión ordinaria y las últimas porciones a presión reducida. Una vez evaporado completamente el disolvente se mantenía en el vacío y en baño de agua a 100° C., durante 15 minutos. El matras era puesto en un desecador donde se dejaba enfriar hasta la temperatura del laboratorio y se pesaba. El material resultante, una grasa líquida a la temperatura ordinaria (aceite) es de composición química ya conocida, descrita por R. Lahoz y D. Rodríguez (1.961) (28).

El peso de grasa obtenida fué: 1,2343 gr. O sea un 29,3%, respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido nuevamente a extracción empleando esta vez éter sulfúrico, como disolvente. La extracción se dió por terminada, cuando al tomar en un vidrio de reloj unas gotas del éter sulfúrico que baja de la cámara de extracción y eva-

poradas estas no dejaron residuo alguno. Esta segunda extracción duró 20 horas.

El micelio se secó análogamente a como se hizo en la fracción anterior, & sea desconectado el percolador se dejó en posición vertical durante 24 horas, una vez secos micelio y algodón se colocó el percolador en una estufa a 40° C., durante una hora y a continuación se pasó a través del aparato una corriente de aire durante una hora.

El micelio así seco era extraído del percolador con guano cuidado y colocado en un pesasustancias, y este en un desecador con el fin de preservar el micelio de la humedad ya que es muy higroscópico. Una vez a la temperatura ambiente fué pesado. El peso residual de micelio después de éstas dos extracciones fué 2,7620 gr. Siendo la pérdida de peso de un 35,0% que corresponde a la fracción I, fracción II y compuestos volátiles. El peso de ésta fracción II se obtuvo por diferencia entre el peso de micelio inicial y la suma del peso de la fracción I y peso de micelio residual. Así pues en esta segunda fracción están acumulados los compuesto volátiles.

El extracto etéreo ora de color rojo-amarillento intenso. El disolvente se destiló sobre baño maría primeramente a presión ordinaria y las últimas porciones a presión reducida. Una vez evaporado completamente el disolvente se mantuvo a vacío y en baño de agua a 100° C., durante 15 minutos.

Esta fracción parecía estar formada por algún ó algunos compuestos de naturaleza fenólica, puesto que disolviendo una pequeña cantidad de la misma en alcohol etílico absoluto y tratando esta solución por unas gotas de otra de Cl_3Fe , también en alcohol se obtenía una intensa coloración verde.

Peso de la II fracción fué de 0,2139 gr. que representa un 5,7% del peso del micelio seco inicial.

c) Extracción con agua fría.

Un gramo de micelio ya extraído por disolventes orgánicos, como se acaba de describir, se extrajo con agua a la temperatura ambiente; procediéndose como sigue:

Del peso del micelio residual, se tomó exactamente - 1,0000 gr. y se puso en un vaso de precipitados de 250 ml. con 100 ml. de agua destilada. Se introdujo en la suspensión de mi-

celle en agua un agitador accionado por un pequeño motor, de manera que esta suspensión permaneciera constantemente en agitación. El tiempo de extracción fué una hora. A continuación la suspensión de micelio se filtró y el líquido procedente de esta primera extracción fué recogido en un matraz eslavmeyer. El papel de filtro que estaba sobre el embudo y contenía el micelio que no se había quedado adherido al vaso al efectuar la filtración, se perforó con una varilla y sobre él se vertieron con sumo cuidado otras 100 ml. de agua destilada, con el objeto de recoger todos los restos de micelio que allí había. Este líquido con el micelio que arrastraba fué recogido en el mismo vaso anterior y así el micelio residual de la primera extracción ahora se tenía todo en el vaso con 100 ml de agua destilada. Sometiéndose nuevamente a una segunda extracción, con agitación durante una hora, como anteriormente se detalla.

El líquido procedente de esta segunda extracción, se recogió, en el matraz eslavmeyer, mezclándolo con el procedente de la primera extracción. De nuevo el papel de filtro que contenía los restos de micelio de esta segunda extracción se perforó con una varilla y sobre él se agregaron otros 100 ml. de agua

destilada, para arrastrar las partículas de micelio al vaso de precipitados. A continuación se efectuó la tercera extracción de la suspensión de micelio durante una hora con agitación mecánica. El filtrado de esta tercera extracción fué despreciado.

El micelio restante se puso a secar en estufa a 25° C., durante dos días, a continuación se puso una hora en un desecador y después fué pesado siendo el peso resultante de 0,6166 gr. Por lo que el agua extraída

$$1,000 - 0,6166 \text{ gr.} = 0,3834 \text{ grs.}$$

Los 200 ml. de extracto acuoso se agitaron energicamente con el fin de homogeneizarlo. Dicho extracto fué dividido en dos partes. En la primera parte se determinaron los azúcares allí existentes por cromatografía sobre papel y en la segunda se analizaron los azúcares reductores totales por el método de Zmogry (43).

Además se determinó cuantitativamente el gunitol mediante medidas densitométricas de los cromatogramas.

Determinación cualitativa de azúcares por cromatografía sobre papel.

A 100 ml. de extracto acuoso descrito anteriormente se

agregó 1 ml. de acetato básico de plomo (5) para precipitar sustancias que pudieran interferir en la cromatografía. El precipitado formado, flocculento y de un ligero color amarillo, fue separado por filtración. Al líquido filtrado se le agregó una gota más de acetato básico de plomo, se agitó el matras y ya no apareció más precipitado. Se filtró, y de este filtrado, se hizo directamente la cromatografía, pues la baja concentración salina de la disolución de azúcares no interfería en esta, como vimos en experimentos preliminares.

La cámara cromatográfica se tenía preparada con el disolvente empleado: Butanol: Ácido acético: Agua, en la proporción de 40: 10: 22 v/v. y a una temperatura constante de 20° C.

El papel de filtro usado, Whatman n° 1., fue cortado en tiras de 24 x 25 cm. Siendo colocadas las muestras del líquido problema, a una distancia de 5 cm. de la parte superior de la hoja de papel y equidistando de los bordes laterales, así como entre ellas 4 cm. Estas muestras, se aplicaron, con micropipetas de 100 microlitros.

En cada hoja de papel se pusieron dos muestras, una de 0,05 ml. y otra de 0,1 ml. Para evitar que el tamaño de las man

chas se hiciese excesivamente grande se pusieron cada vez fracciones de 0,01 ml., secando a cada adición con aire templado antes de agregar la siguiente. Además en sus sitios respectivos se colocaron cuatro patrones: glucosa, xilosa, maltosa, y manitol. Estos azúcares fueron los que se habían hallado y caracterizado como tales en cromatografías de tanteo, hechas en experiencias anteriores.

La hoja de papel una vez preparada y seca se colocó en la cámara cromatográfica. Se siguió el procedimiento de cromatografía descendente. La separación de los azúcares se consiguió en 48 horas. El papel se tuvo 16 horas en la cámara cromatográfica, al cabo de las cuales se sacó y dejó secar, esta operación se repitió durante tres días consecutivos.

Pasadas las 48 horas, y una vez seca la hoja de papel, se reveló introduciéndola con rapidez en una cubeta que contenía el reactivo de plata. A continuación se puso a secar, y después fue pulverizada con el revelador (solución 0,5 N. de NaOH en etanol de 96%). En la cromatografía aparecieron manchas marrones muy bien contrastadas a la temperatura ambiente, en el sitio donde se encontraban los azúcares.

Debido a que el cromatograma se ennegrece por la acción de la luz, se fijó este introduciendo el cromatograma seco, después de haber sido pulverizado éste con el revelador, en una solución fijadora (NH_4OH 6N), durante 5 minutos. Después fue lavado con agua y secado.

En esta primera muestra quedaron determinados los siguientes azúcares y polialcoholes dados por orden de mayor desplazamiento en la cromatografía sobre papel:

Xilosa.

Manitol.

Glucosa.

Maltosa (indicio).

Como se observa en la figura n° 5.-

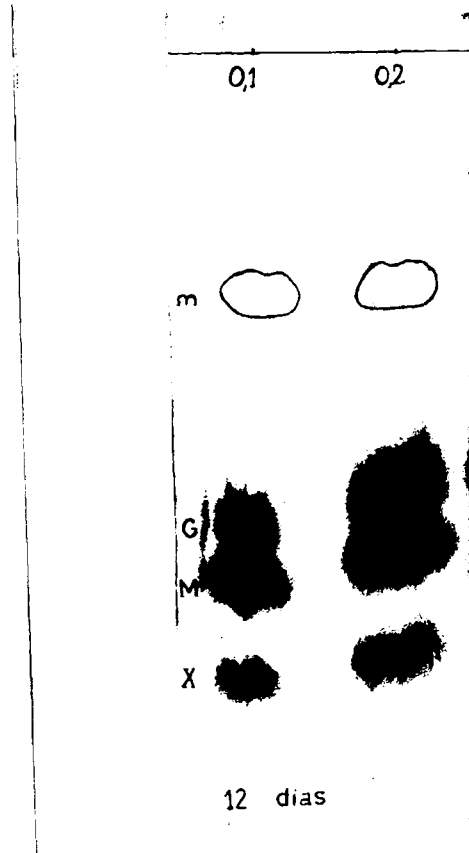


Fig. 5.- Cromatograma correspondiente a la primera muestra (12 días de incubación).

Determinación de azúcares reductores totales por el método de Somogyi. (43).

Primeramente se determinó el pH del extracto acuoso, siendo éste pH 7,1; así pues directamente del extracto se tomaron muestras para llevar a cabo el método de Somogyi.

Das muestras consistentes cada una en 2 ml. y otras dos de 4 ml. del extracto acuoso se colocaron en sus correspondientes tubos de ensayo de 25 x 200 mm. y las cuatro muestras fueron llevadas a 5 ml. con agua destilada. Además se prepararon dos ensayos en blanco poniendo en dos tubos, como los anteriores, esto es de 25 x 200 mm., 5 ml. de agua destilada en cada uno. A continuación se agregó a cada tubo con una pipeta 5 ml. del reagente alcalino de cobre, agitando cada tubo para homogeneizar la mezcla. Todos los tubos fueron cerrados con un bulbo de vidrio y colocados en una gradilla metálica. Dicha gradilla, conteniendo los tubos se sumergió en un baño de agua hirviendo vigorosamente, existiendo una diferencia de nivel de unos 5 cm. entre el agua hirviendo del baño y el líquido contenido en los tubos. Los tubos permanecieron en el baño de agua hirviendo 10 minutos. Transcurridos éstos y con cuidado se colocó la gradilla en un

baño de agua fría, en el cual, se tenía 3 minutos a fin de que su temperatura llegase a ser de unos 25° a 30° C. Se tuvo sumo cuidado en no agitar los tubos durante los periodos de calentamiento y enfriamiento:

En el fondo de los tubos que contenían los 2 y 4 ml. de extracto acuoso se vió un ligero depósito de Cu_2O rojo.

A continuación se añadían a cada tubo 2 ml. de IK al 2,5%, se procuró que estos 2 ml. de IK, quedasen encima del líquido formando como un halo transparente, o sea sin mezclarse. Después con una bureta de vertido rápido se añadieron a cada tubo 1,5 ml. de SO_4H_2 2N, a la vez se agitaron todos los tubos de manera que todo el yodo liberado oxidara completamente el cobre reducido. Transcurridos 5 minutos se volvieron a agitar los tubos y el exceso de yodo liberado que no fué reducido por las iones cuprosas, se valoró con tiosulfato 0,005 N. Como indicador se empleó almidón.

Para el control se gastó 19,1 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 18,5 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 17,8 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Hallando las diferencias entre el blanco y la muestra se obtienen:

Para la muestra de 2 ml. se gastó 0,6 ml. de $S_2O_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 1,3 ml. de $S_2O_3^{--}$.

Se ve que guardaron una relación lineal. Para 1,3 ml. de $S_2O_3^{--}$, corresponden 0,1755 mgr. de azúcares reductores (Ver gráfica pag. 34). O sea 4 ml. de la muestra tienen 0,1755 mgr. de azúcares reductores totales, luego 200 ml. tendrán 8,775 mgr. y estos provienen de un gramo de micelio extraído.

Como un gramo de micelio extraído por disolventes orgánicos correspondía a 1,5371 gr. de micelio inicial, un gramo de micelio sin extraer contiene 570,0 mgr. de azúcares reductores o sea 0,57 gr%. (0,57 gr. de azúcares reductores totales por 100,0 gr. de micelio seco inicial).

Determinación cuantitativa de manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las manchas en un densitómetro Elphor.

Las manchas producidas por el manitol en la cromatografía anteriormente hecha, fueron cortadas en tiras de tamaño convenien-

te para ser colocadas en la escala del densitómetro. La transparencia se consiguió introduciendo dichas bandas en glicerina. Una vez la banda dentro del aparato este se ajustó a cero. El cursor se movía a mano y cada milimetro que avanzaba este daba lugar a una variación de la intensidad cuyos valores fueron llevados sobre papel milimetrado. Se obtuvieron curvas reproducibles ya que la lectura se hacía de izquierda a derecha y de derecha a izquierda. La superficie de la curva fué medida con un planímetro manual. Se obtuvo una superficie para la muestra de 0,05 ml. Esta se multiplicó por 2 y se halló la media entre este valor y el obtenido para la muestra 0,1 ml. Esta superficie fué de 448 mm^2 , a la cual corresponden $24,5 \gamma$ (Ver gráfica pag. nº 41). Si en 0,1 ml. había $24,5 \gamma$ de manitol en 200 ml. había 49, mgrm. Estos 49 mgrm., corresponden a 1 gr. de micelio extraído por disolventes orgánicos y representan el 3,19 gr% de micelio inicial.

T A B L A I.

La tabla siguiente agrupa todos los datos relativos a la primera muestra. (12 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	4,10
Color del líquido de cultivo	amarillo claro.
Glucosa residual.	1,5%.
Peso del micelio seco.	4,2456 gr.
Gramos de micelio por matras	0,8495 gr.
I Fracción.	29,3 gr.%
II Fracción.	5,7 gr.%
Peso del micelio extraído por disol- ventes orgánicos.	2,7620 gr.
Peso del residuo de la extracción asup sa.	0,6166 gr.
Asúcares caracterizados.	Glucosa, Xilosa, Maltosa, y Manitol.
Manitol.	3,17 gr.%
Asúcares reductores totales.	0,57 gr.%

En esta primera muestra han sido expuestas con detalle todas las operaciones llevadas a cabo.

En las muestras que siguen, y con el fin de no repetir, solo se indicarán los valores finales obtenidos.

Segunda muestra.

Fue tomada a los 18 días de edad de los cultivos. El líquido metabólico presentó un color análogo a la primera muestra, o sea amarillo claro, siendo su pH de 4,00. La determinación polarimétrica de la glucosa residual en el líquido metabólico dió un valor de cero, lo cual nos indicó que se había consumido totalmente la fuente carbonada.

El peso del micelio correspondiente a los 5 matraces fue de 5,3540 gr. correspondiendo 1,0708 gr. por matras. Se observó que el pH permanecía constante, así como un mayor peso del micelio respecto a la muestra anterior. Para las siguientes operaciones se partió de 5,3540 grs. de micelio pulverizado.

a) I Fracción.

El micelio fue sometido a extracción con éter de petróleo durante 20 horas, siendo el peso de grasa obtenido 1,2314 gr. que representa un 23,0% del peso de micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fue sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de la II fra-

cción (extracto etéreo más volátiles) fué de 0,7067 gr. ó sea un 13,2 % respecto del micelio seco inicial.

El peso de micelio residual después de estas dos extracciones fué de 3,4159, lo que indica que la fracción I y la II, representan una pérdida de peso en el micelio inicial de un 36,2%

e) Extracción con agua fría.

Un gramo de micelio residual se extrajo por agitación mecánica con 100 ml. de agua destilada durante una hora; esta operación como anteriormente, se efectuó tres veces consecutivas. Análogamente la última extracción fué despreciada. El micelio extraído pesó 0,6207 gr. por lo que el agua extrajos

$$1,0000 - 0,6207 = 0,3793 \text{ gr.}$$

El estudio de este extracto se realizó en tres partes:

I.- Determinación cualitativa de azúcares por cromatografía sobre papel.

En esta muestra quedaron caracterizados los siguientes azúcares y polialcoholes por orden de mayor desplazamiento en la cromatografía:

Milosa.

Manitol.

Glucosa.

Maltosa (indioles).

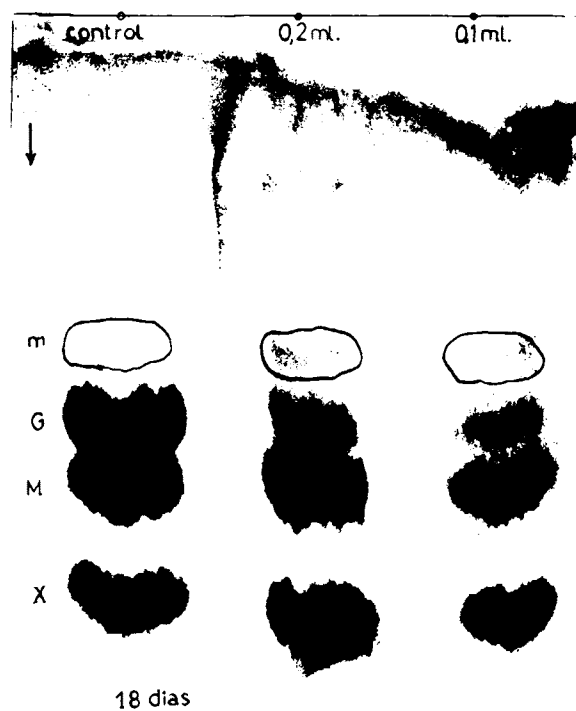


Fig. 6.- Cromatografía correspondiente a la segunda suag
tra (18 días de incubación).

II.- Determinación cuantitativa de manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las manchas en un densitómetro Elphor. Los datos obtenidos son:

La densitometría de la mancha de manitol producida por 0,1 ml. de líquido problema dió una superficie 463 mm^2 , a esta superficie le corresponden 25,6 γ de manitol (Ver gráfica pag. nº 42). Si a 0,1 ml. le corresponden 25,6 γ a las 200 ml. del extracto le corresponderán 51,2 mgr. Lo que equivale a un 3,26% de micelio seco inicial.

III.- Determinación cuantitativa de azúcares reductores totales.

Método de Senegyi.

Para el control se gastó 19,1 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 18,5 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 17,9 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Hallando las diferencias entre el blanco y la muestra se tiene:

Para la muestra de 2 ml. se gastó 0,6 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 1,2 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Como se observa, guardan una relación lineal. Para 1,2 ml. de $S_2O_3^{2-}$, corresponden 0,162 mgr. de azúcares reductores (Ver gráfica pag. n° 34), y estos corresponden a 4 ml. de la muestra, luego, los 200 ml. tendrán 8,1 mgr. que son los azúcares reductores que hay en un grano de micelio extraído, representando el 0,51 gr %, de micelio seco inicial.

T A B L A I I

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la segunda muestra (18 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	4,0
Color del líquido de cultivo	amarillo claro.
Glucosa residual	0
Peso del micelio	5,3540 gr.
Granos de micelio por matraz.	1,0708 gr.
I Fracción.	23,0 gr. %.
II Fracción	13,2 gr. %.
Peso del micelio extraído por disol-	
ventes orgánicos.	3,4159 gr.
Peso del residuo de la extracción -	

azucosa.	0,6207
Azúcares caracterizados	Glucosa, Xilosa, Maltosa, y manitol.
Manitol	3,26 gr %
Azúcares reductores totales.	0,51 gr.%

Tercera muestra.

Fue tomada a los 24 días de edad de los cultivos.

El líquido metabólico presentaba una coloración amarillorrojo con tonalidad verde fluorescente. En esta muestra ya no se llevó a cabo la determinación de glucosa residual, puesto que había sido consumida totalmente a los 18 días de incubación ó sea en el líquido metabólico procedente de la segunda muestra. La determinación de pH del líquido metabólico dió para éste el valor $\text{pH} = 4,65$. El peso del micelio correspondiente a las 5 matraces fue de 6,0649 gr., equivalente a 1,2129 gr. por matraz. Se observó un ligero incremento en el pH y un mayor peso del micelio respecto a la muestra anterior.

Una vez triturado el micelio, se tomaron 5,0264 gr., y a partir de esta cantidad se llevó a cabo la primera extracción.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a extracción con éter de petróleo (50 - 70°), durante 20 horas; siendo el peso de grasa obtenido de 1,3438 gr. ó sea un 22,3%, respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de la II fracción (extracto etéreo más volátiles), fué de 0,6664 gr. que representa el 11,0% del peso del micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extracciones, fué de 4,0162 gr., lo que indica que la Fracción I y la II representan un 33,3 % del micelio seco inicial.

c) Extracción con agua fría.--

Un gramo de micelio residual se extrajo por agitación mecánica con 100 ml. de agua destilada durante una hora; esta operación como siempre se efectuó tres veces consecutivas. Análogamente la última extracción fué despreciada. El micelio extraído, pesó 0,5641 gr. por lo que el agua extrajo:

$$1,0000 - 0,5641 = 0,4359 \text{ gr.}$$

El estudio de este extracto se realizó en tres partes:

I.- Determinación cualitativa de azúcares por cromatografía sobre papel.

En esta muestra quedaron caracterizados los siguientes azúcares y polialcoholes dados por orden de mayor desplazamiento en la cromatografía.

Xilosa.

Manitol.

Glucosa.

Maltosa. (indicio).

Como se observa en la figura nº 7.

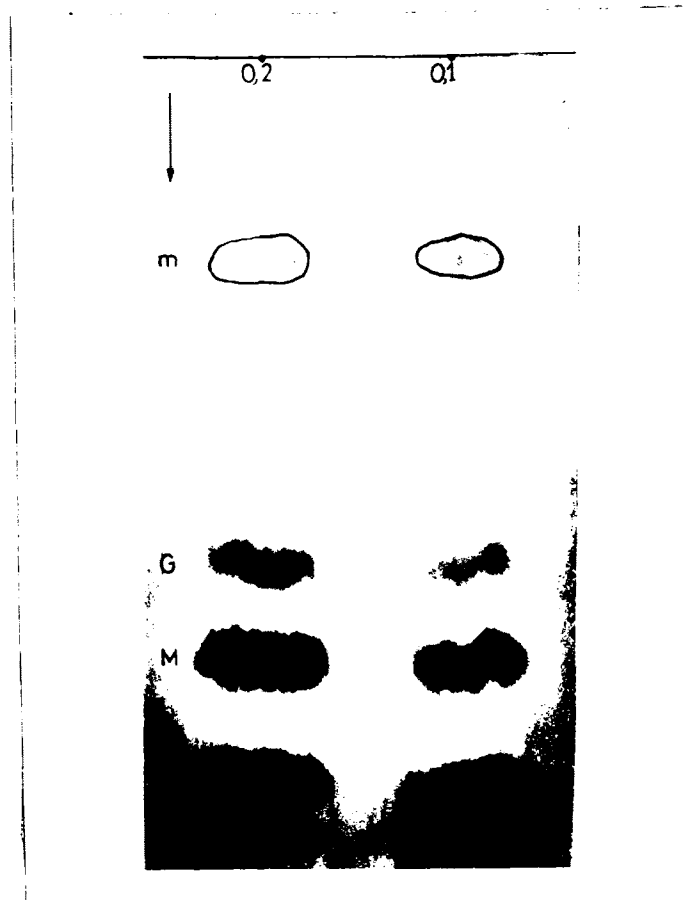


Fig. 7.- Cromatografía correspondiente a la tercera muestra (24 días de incubación).

II.- Determinación cuantitativa de manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las manchas en un densitómetro Elphax. Los datos obtenidos son:

La densitometría de la mancha de manitol producida por 0,1 ml. de líquido problema dió una superficie de 350 mm^2 , a

esta superficie le corresponden 19,2 γ de manitol (Ver gráfica pag. nº 42). Si a 0,1 ml. le corresponde 19,2 γ , á 200 ml. le corresponde 38,4 mgr., lo que representa el 2,53% de micelio inicial.

III.- Determinación cuantitativa de azúcares reductores totales.

Método de Somogyi.

Para el control se gastó 19,0 ml. de $S_2O_3^{=}$.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 17, ml. de $S_2O_3^{=}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 15,2 ml. de $S_2O_3^{=}$.

Hallando las diferencias entre el blanco y la muestra se tiene:

Para la muestra de 2 ml. se gastó 2,0 ml. de $S_2O_3^{=}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 3,8 ml. de $S_2O_3^{=}$.

Como se ve guardan una relación lineal. Para 3,8 ml. de $S_2O_3^{=}$., corresponde 0,5130 mgr. de azúcares reductores (Ver gráfica pag. nº 34), y estos corresponden a 4 ml. de la muestra, luego los 200 ml. tendrá 25,65 mgr. y éstos corresponden á un gramo de micelio extraído por disolventes orgánicos, equivalente a

1,69 % de micelio inicial.

T A B L A I I I

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la tercera muestra. (24 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	4,55.
Color del líquido de cultivo	amarillo-marrón con te- nacidad verde (fluores- cente).
Peso del micelio	6,0649 gr.
Gramos de micelio por matraz	1,2129 gr.
I Fracción.	22,3 %
II Fracción.	11,0 %
Peso micelio extraído por disolventes orgánicos.	4,0162 gr.
Peso del residuo de la extracción acuosa.	0,5641 gr.
Azúcares caracterizados.	Glucosa, Xilosa, Maltosa, Manitol.
Manitol.	2,53 gr %.
Azúcares reductores totales.	1,69 gr. %.

Cuarta muestra.

Esta muestra fué tomada a los 30 días de edad de los cultivos.

El líquido metabólico presentó una coloración marrón rojiza. La determinación de pH de dicho líquido dió un valor de pH = 8,0.

El peso del micelio procedente de los 5 matraces fué de 6,1775 gr., correspondiendo 1,2351 gr. por matraz. Respecto a la muestra anterior hay un ligero incremento en el peso del micelio y una subida brusca del pH.

Una vez triturado el micelio, se pesaron 6,1609 gr. y a partir de esta cantidad fué llevada a cabo la primera extracción.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a un proceso de extracción con éter de petróleo durante 20 horas, la grasa obtenida pesó 1,2937 gr. que representan el 21,0 % respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de esta fracción (extracto etéreo más volátiles), fué de 0,6235 gr. ó sea, el 10,1 % del peso del micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extracciones fué de 4,2417 gr. Así pues, la I Fracción y II Fracción representan una pérdida de peso en el micelio inicial de un 31,1%.

c) Extracción con agua fría.

Un gramo de micelio residual fué extraído con agitación mecánica en 100 ml. de agua destilada durante una hora; esta operación como siempre se efectuó tres veces consecutivas; análogamente el extracto obtenido en la tercera extracción fué despreciado. El micelio extraído pesó 0,5820 gr., por lo que el agua extraje:

$$1,0000 - 0,5820 = 0,4180 \text{ gr.}$$

El estudio de este extracto se realizó en tres partes:

I.- Determinación cualitativa de azúcares por cromatografía sobre papel.

En esta muestra quedaron caracterizados los siguientes

azúcares y polialcoholes dados por orden de mayor desplazamiento en la cromatografía:

Xilosa.

Manitol.

Glucosa.

Maltosa. (indicios).



Fig. 8.- Cromatografía correspondiente a la cuarta muestra. (30 días de incubación).

II.- Determinación cuantitativa de manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las manchas obtenidas en la cromatografía con un densitómetro Elphor.

Los datos son:

La densitometría de la mancha de manitol producida por 0,1 ml. de líquido problema dió una superficie de 366 mm^2 , a esta superficie le corresponden 19,6 γ de manitol (Ver gráfica pag. nº 42). Si a 0,1 ml. le corresponden 19,6 γ a 200 ml. le corresponderán 39,2 mgr. lo que representa el 2,69 gr%. de azúcar inicial.

III.- Determinación cuantitativa de azúcares reductores totales.

Método de Somogyi.

Para el control se gastó 19,2 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 17,7 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 16,2 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Hallando las diferencias entre el blanco y la muestra se tiene:

Para la muestra de 2 ml. se gastó 1,5 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 3,0 ml. de $S_2O_3^{--}$.

Como se ve guardan una relación lineal. Para 3,0 ml. de $S_2O_3^{--}$, corresponden 0,405 mgr. de azúcares reductores (Ver gráf. en pag. nº 34), y estos corresponden a 4 ml. de la muestra, luego los 200 ml. tendrán 20,25 mgr. y éstos provienen de un gramo de micelio extraído por disolventes orgánicos representando 1,39 gr %, del micelio inicial.

En esta muestra se determinó fósforo y magnesio; análogamente se hizo en las muestras tomadas cada 12 días a partir de esta, con el objeto de ver la variación de dichos elementos durante la fase autolítica del crecimiento.

En esta muestra se explica detalladamente los procedimientos seguidos para estas determinaciones; en las muestras siguientes se indicarán los datos obtenidos.

d) Determinación del fósforo.

Se siguió el método de Fiske y Subbarow, según se describe así en el apartado "Materiales y Métodos". (Pag. 43) determinándose el fósforo total existente en el micelio. Se pesó exactamente 100,0 mgr. de micelio seco, se calentó en un matras Kjeld-

dahl, hasta total carbonización en presencia de 3 ml. de SO_4H_2 .
5N. y un crucito de porcelana porosa. El final de la reacción viene dado por el desprendimiento de vapores blancos caracterizados de SO_3 . (Se llevó a cabo en vitrina). Una vez frío el matraz, resbalando por las paredes se añadió una gota de HNO_3 concentrado, que oxidó la materia orgánica y libera CO_2 , decolorándola, se agregaron a continuación una ó dos gotas más de HNO_3 , hasta total decoloración. Se desprendían vapores rojos de NO_2 y una vez agotados estos, se veían nuevamente los vapores blancos de SO_3 . A continuación, se enfrió ligeramente y se añadieron 5 ml. de agua destilada; el matraz se colocó en un baño maría hirviendo durante 10 minutos para hidrolizar el pirofosfato. El volumen se llevó a 100 ml. A partir de estos 100 ml., se tomaron tres muestras de 4, 5, y 6 ml. respectivamente en tubos de ensayo aferados a 10 ml. Se añadió a cada tubo de ensayo 1 ml. de molibdato ácido, 0,4 ml. de siconógeno y se completaron a 10 ml. con agua destilada. Una vez desarrollado el color azul que se forma se hicieron las lecturas en un fotocolorímetro Klett-Summerson, empleando el filtro rojo nº 66.

<u>Volumen</u> <u>Sol. Probl.</u>	<u>Lecturas uni</u> <u>dades Klett.</u>	<u>Concentraci3n.</u>	<u>Media.</u>
4 ml.	540 u.K.	80 γ	
5 "	645 " "	99 "	19,8 γ / ml.
6 "	750 " "	118 "	

Para ver la correspondencia entre u.K. y concentraciones ver gráfica pag. 48).

1 ml. de la soluci3n equivale a 1 mgr. de micelio.

1 mgr. tiene 19,8 γ de P.

1 gr. 19.800 γ = 19,8 mgr.

El P. representa el 1,98 % del micelio.

e) Determinaci3n volumétrica del Mg. por complexometría.

Se partió de 100,0 mgr. de micelio, su digesti3n se llevó a cabo de manera análoga a como se acaba de describir para el f3sforo. El volumen final se llevó a 10 ml.

De aquí se tomaron muestras para determinaci3n del Mg. Estas fueron primeramente neutralizadas a pH 7 - 8, con NaOH N;

después su volumen se completó a 10 ml. con agua destilada (nuestras aferado). A continuación se añaden 2 ml. de solución también, 2 ml. de GHE y 5 gotas de negro de eriocromo T. y se valora con la solución de E.D.T.A.

<u>Volumen sol.</u> <u>problema.</u>	<u>ml. de E.D.T.A.</u>	<u>Medio.</u>
1 ml.	1,8 ml.	
2 ml.	3,8 ml.	1,8 ml.
3 ml.	5,4 ml.	

En esta experiencia 1 ml. de solución de E.D.T.A. = 22,22 mg. (Ver pag. nº 52).

1 ml. de solución tiene 10 mgr. de nicotina.

10 mgr. tienen 39,996 % de Mg.

El Mg. representa el 0,4 gr. del peso de nicotina.

T A B L A IV.

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la cuarta muestra. (30 días de incubación).

pH del líquido de cultivo. 8,0.

Color del líquido de cultivo.	marrón-rojizo.
Peso del micelio	6,1775 gr.
Gramos de micelio por matras.	1,2831 gr.
I Fracción	21,0 gr %.
II Fracción.. . . .	10,1 gr %.
Peso del micelio extraído por disolven- tes orgánicos.	4,2417 gr.
Peso del residuo de la extracción acuo- sa.	0,5820 gr.
Azúcares caracterizados	Glucosa, Xilosa, Malto- sa y Manitol.
Manitol	2,69 gr. %
Azúcares reductores totales.	1,39 gr %.
Fósforo.	1,98 gr %.
Magnesio.	0,4 gr %.

Quinta muestra.

Esta muestra fue tomada a los 36 días de edad de los cul-
tivos.

El líquido metabólico presentó como en la muestra anterior
una coloración marrón-rojiza y su pH era de 8,1.

El peso de micelio procedente de los 5 matraces fué de 5,9203 gr. correspondiendo 1,184 gr. por matras. Respecto a la muestra anterior hay un ligero decrecimiento en el peso del micelio y el pH como vemos permaneció constante.

Se trituró el micelio seco y de este material triturado se tomaron 5,8757 grs. para efectuar las extracciones con disolventes orgánicos.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a un proceso de extracción con éter de petróleo (50° - 70°)., durante 20 horas, la grasa obtenida pesó 1,1516 gr. que representan el 19,6 %, respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de esta fracción (extracto estéreo más volátiles), fué de 0,4352 gr., que representan el 7,4% del peso del micelio seco inicial. El peso residual de micelio después de estas dos extracciones fué de 4,2890 gr. por tanto la Fracción I y la II, representan una pérdida de peso

del 27,0 % del micelio inicial.

T A B L A V.

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la quinta muestra.
(36 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,1
Color del líquido de cultivo	marrón - rojizo.
Peso del micelio.	5,9203 gr.
Gramos de micelio por matras.	1,1840 gr.
I Fracción	19,6 gr %.
II Fracción	7,4 gr %.
Peso del micelio extraído por disolven- tes orgánicos.	4,2890 gr.

Sexta muestra.

Se tomó dicha muestra a los 42 días de edad de los cul-
tivos. El líquido metabólico presentó una coloración marrón-ro-
jiza y un pH de 8,1.

El micelio procedente de las 5 matraces dió un peso de
5,3705 gr. correspondiendo 1,0741 gr. por matras. Respecto a

la muestra anterior el pH permaneció constante, se aprecia un crecimiento en el peso del micelio.

Una vez triturado el micelio se pesó nuevamente para llevar a cabo la primera extracción con disolventes orgánicos, a partir de una cantidad conocida de micelio. Este peso inicial fué de 5,1286 gr.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a un proceso de extracción, con éter de petróleo ($50^{\circ} - 70^{\circ}.C$), durante 20 horas. Evaporado el disolvente, la grasa obtenida pesó 0,8746 gr., lo que representa el 16,4% respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de ésta fracción (extracto etéreo más volátil), fué de 0,4152 gr; que representan el 7,7 % respecto del peso del micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extracciones fué de 4,0388 gr., así pues la primera y segunda fracción representan una pérdida de peso en el micelio inicial de 24,1 %.

c) Extracción con agua fría.

Un gramo de micelio residual fué extraído con agitación mecánica empleando 100 ml. de agua destilada, a la temperatura ambiente, durante una hora. Esta operación como siempre se efectuó tres veces consecutivas; análogamente la última extracción fué despreciada. El micelio extraído pesó 0,6429 gr. por lo que el agua extraje.

$$1,0000 - 0,6429 = 0,3571 \text{ gr.}$$

El estudio de este extracto se realizó en tres partes:

I.- Determinación cualitativa de azúcares por cromatografía sobre papel.

En esta muestra quedaron caracterizados los siguientes azúcares y polialcoholes dados por orden de mayor desplazamiento en la cromatografía.

Xilosa.

Manitol.

Glucosa.

Malteen. (indicios).



Fig. 9.- Cromatografía correspondiente a la sexta muestra (42 días de incubación).

II.- Determinación cuantitativa de manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las manchas obtenidas en la cromatografía con un densitómetro Elphor. Los datos obtenidos son:

La densitometría de la mancha de manitol producida por

0,1 ml. de líquido problema dió una superficie de 466 mg^2 ; correspondiendo a esta superficie $25,8 \gamma$ de manitol (Ver gráfica pag. nº 42). Si a 0,1 ml. le corresponden $25,8 \gamma$ a 200 ml. le corresponderá $51,6 \text{ mgr.}$ los cuales representan el $3,91 \%$ del micelio seco inicial.

III.- Determinación cuantitativa de azúcares reductores totales.

Método de Somogyi.

Para el control se gastó 19,9 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 18,3 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 16,3 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Hallando las diferencias entre el blanco y la muestra se obtiene:

Para la muestra de 2 ml. se gastó 1,6 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 3,3 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Como se ve guardan una relación lineal. Para 3,3 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$, corresponden 0,432 mgr. de azúcares reductores (Ver gráfica pag. nº 34), como estos corresponden a 4 ml. de la muestra, a 200 ml. le corresponderán 21,60 mgr. y estos provienen de

un gramo de micelio extraído por disolventes orgánicos y equivalen a 1,64 gr %. de micelio seco inicial.

d) Determinación del P.

Se partió de 100,0 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó el carbono tratado con HNO_3 , concentrado hasta desaparición de los vapores rojos.

Después su volumen se llevó a 100 ml. en un matras aferado. Se tomaron muestras de 4, 5, y 6 ml. respectivamente, los datos obtenidos son:

<u>Volumen sol.</u> <u>problema.</u>	<u>lecturas uni</u> <u>dadas Klett.</u>	<u>Concentración.</u>	<u>Medio.</u>
4 ml.	475,0 u.K.	70,0 %	
5 ml.	587,5 u.K.	88,5 %	17,65 % / ml.
6 ml.	700,0 u.K.	107,0 %	

Para ver la equivalencia entre u.K. y concentraciones, ver gráfica pag. nº 48.

1 ml. de solución equivale a 1 mgr. de micelio.

1 mgr. tiene. 17,65 %

1 gr. tiene. 17650 γ = 17,65 mgr.

El fósforo representa el 1,765 gr. % del micelio.

e) Determinación del magnesio.

Se parte del 100,0 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó materia orgánica.

Su volumen se llevó a 10 ml. en un matras aferado.

Se tomaron muestras de 3 ml. y 4 ml., se neutralizaron a pH 7 - 8, con NaOH N., completando su volumen a 10 ml. con agua destilada. Se añaden a continuación 2 ml. de solución tan pta 2 ml. de CHK y 5 gotas de negro de eriocromo T y se valora con la solución E.D.T.A.

<u>Volumen sol. problema.</u>	<u>ml. de E.D.T.A.</u>	<u>Media.</u>
-------------------------------	------------------------	---------------

3 ml.	5,1 ml.	
4 ml.	6,8 ml.	1,7.

1 ml. de solución de E.D.T.A. = 22,22 γ de Mg.

1 ml. de solución problema, tiene. . . 10 mgr. de micelio.

10 mgr. de micelio tienen. 37,774 γ de Mg.

T A B L A. VI.

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la sexta muestra.
(42 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,1.
Color del líquido de cultivo.	marrón-rojizo.
Peso del micelio.	5,3705 gr.
Granos de micelio por matras.	1,0741 gr.
I Fracción	16,4 gr %.
II Fracción.	7,7 gr %.
Peso del micelio extraído por disolven tes orgánicos.	4,0388 gr.
Peso del residuo de la extracción asug na.	0,6429 gr.
Azúcares caracterizados.	Glucosa, Xilosa, Maltosa, y Manitol.
Manitol	3,91 gr. %.
Azúcares reductores totales.	1,64 gr %.
Fósforo	1,765 gr %.
Magnesio.	0,377 gr %.

Septima muestra.

Esta muestra fué tomada a los 48 días de edad de los cul-

tivos.

El líquido metabólico presentó como en la muestra anterior una coloración marrón - rojiza y un pH igual que el de la muestra anterior, o sea de 8,1.

El peso del micelio procedente de los 5 matraces fué de 5,0992 gr. El peso de micelio por matras fué de 1,0198 gr.

Una vez triturado el micelio se pesó nuevamente, para llevar a cabo la primera extracción con disolventes orgánicos a partir de una cantidad exactamente conocida de micelio. Su peso fué de 5,0113.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a un proceso de extracción, con éter de petróleo (50° - 70° C.), durante 20 horas. La grasa obtenida pesó 0,8299 gr. que representan el 16,5 % respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de ésta fracción

(extracto etéreo más volátiles), fué de 0,3715 gr. que representan el 7,4 % respecto del peso de micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extracciones fué de 3,8099 gr. por lo que las fracciones I y II representan el 23,9% del peso del micelio inicial.

T A B L A VII.

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la séptima muestra. (48 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,1.
Color del líquido de cultivo	marrón-rojizo.
Peso del micelio seco	5,0992 gr.
Granos de micelio por matraz.	1,0198 gr.
I Fracción	16,5 gr %.
II Fracción.	7,4 gr %.
Peso del micelio extraído por disolventes orgánicos.	3,8099 gr.

Octava muestra.

Esta muestra fué tomada a los 54 días de edad de los

cultivos. El líquido metabólico presentó una coloración marrón rojiza y un pH de 8,1.

El micelio procedente de los 5 matraces pesó 4,9400 gr., correspondiendo 0,9880 gr. por matras el pH permanecía constante respecto de las muestras anteriores.

Una vez triturado el micelio, se pesó nuevamente para llevar a cabo la primera extracción con disolventes orgánicos, a partir de una cantidad conocida de micelio. Su peso fue de 4,9103 gr.

a) I Fracción.

El micelio fue sometido a un proceso de extracción con éter de petróleo (50° - 70°C.), durante 20 horas, la grasa obtenida pesó 0,8937 gr., lo que representa el 18,2 % respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fue sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de esta fracción (extracto etéreo más volátiles), fue de 0,2818 gr. que representan el 5,7% respecto del peso del micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extracciones fué de 3,7348 gr. Así pues la primera y segunda fracciones representan una pérdida de peso en el micelio inicial de un 23,9 %.

o) Extracción con agua fría:

Un gramo de micelio residual fué extraído con agitación mecánica con 100 ml. de agua destilada, a la temperatura ambiente, durante una hora. Esta operación como siempre se efectuó tres veces consecutivas; análogamente la última extracción fué despreciada. El micelio extraído pesó 0,6796 gr. por lo que el agua extrajo:

$$1,0000 - 0,6796 = 0,3204 \text{ gr.}$$

El estudio de este extracto se realizó en tres partes:

I.- Determinación cualitativa de azúcares por cromatografía sobre papel.

En esta muestra quedaron determinados cualitativamente los siguientes azúcares y polialcoholes dados por orden de mayor desplazamiento en la cromatografía:

Xilosa.

Manitol.

Glucosa.

Maltosa. (indicio).

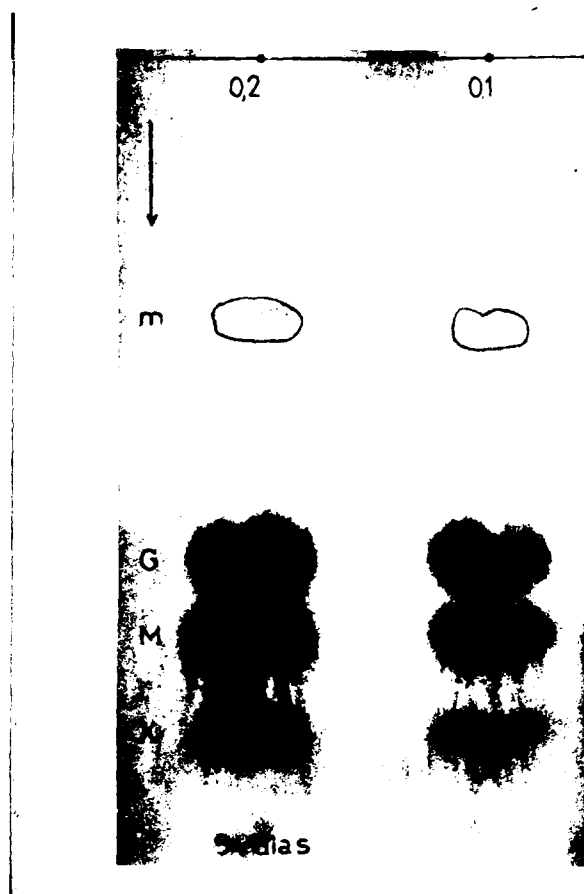


Fig. 10.- Cromatografía correspondiente a la octava muestra.
tra. (54 días de incubación.)

II.- Determinación cuantitativa de manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las manchas obtenidas en la cromatografía con un densitómetro Elphar. Los datos obtenidos son:

La densitometría de la mancha de manitol producida por 0,1 ml. de líquido problema dió una superficie de 406 mm^2 , correspondiendo a esta superficie 25 γ de manitol (Ver gráfica pag. n° 42)., a 200 ml. le corresponderán 50,0 mgr. los cuales representan el 3,80% del peso del micelio seco inicial.

III.- Determinación cuantitativa de azúcares reductores totales.

Método Somogyi.

Para el control se gastó 20,7 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 18,7 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 16,6 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Hallando las diferencias entre el blanco y la muestra se obtiene:

Para la muestra de 2 ml. se gastó 2,0 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 4,1 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Como se ve guardan una relación lineal. Para 4,1 ml. de $S_2O_3^{2-}$, corresponden 0,540 mgr. de azúcares reductores (Ver gráfica pag. nº 34), como estos corresponden a 4 ml. de la muestra a 200 ml. le correspondarán 27 mgr. que provienen de una gramo de micelio extraído por disolventes orgánicos y equivalen a 2,05 % de micelio seco inicial.

d) Determinación del Fósforo.

Se partió de 100,00 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó materia orgánica.

Después su volumen se llevó a 100 ml. en un matraz aforado. Se tomaron muestras de 4, 5, y 6 ml. respectivamente. Los datos obtenidos son:

<u>Volumen sol.</u> <u>problema.</u>	<u>Lecturas uni</u> <u>dades Klett.</u>	<u>Concentración.</u>	<u>Media.</u>
4 ml.	340 u.K.	50,0 γ	
5 ml.	450 u.K.	66,5 γ	12,55 γ/ ml.
6 ml.	535 u.K.	76,0 γ	

Para ver la equivalencia entre u.K. y concentración ver gráfica pag. nº 48.

1 mgr. de solución equivale a 1 mgr. de micelio.

1 mgr. tiene. 12,55 γ

1 gr. tiene. 12550 γ = 12,55 mgr.

El fósforo representa el 1,255 % del micelio.

e) Determinación del Magnesio.

Se partió de 100,0 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó materia orgánica.

Su volumen se llevó a 10 ml. en un matraz aforado.

Se tomaron muestras de 3 y 5 ml. después de neutralizarlas a pH 7 - 8, con NaOH N., se completó su volumen a 10 ml. con agua destilada a continuación se añaden 2 ml. de solución tampón, 2 ml. de CNK, y 5 gotas de negro de eriocromo T., y se valoró con la solución E.D.T.A.

<u>Volumen sol. problema.</u>	<u>M. de E.D.T.A.</u>	<u>Medio.</u>
3 ml.	4,7 ml.	1,5.
5 ml.	7,6 ml.	

1 ml. de solución E.D.T.A. = 22,22 γ de Mg.

1 ml. de solución tiene. . . . 10 mgr. de micelio.

10 mgr. de micelio tienen . . . 34,2188 mgr.

El Mg. representa el 0,342 % del peso del micelio.

T A B L A VIII.

La tabla siguiente agrupa todos los datos relativos a la octava muestra, (54 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,1.
Color del líquido de cultivo.	marrón-rojizo.
Peso del micelio seco.	4,9400 gr.
Gramos de micelio por matraz.	0,9880 gr.
I Fracción.	18,2 gr %.
II Fracción.	5,7 gr %.
Peso del micelio extraído por disolven tes orgánicos.	3,7348 gr.
Peso del residuo de la extracción sup sa.	0,6796 gr.
Azúcares caracterizados.	Glucosa, Mielosa, Maltosa, y Manitol.
Manitol.	3,80 gr.

Astocares reductores totales.	2,05 gr %.
Fósforo.	1,255 gr %.
Magnesio.	0,342 gr %.

Novena muestra.

Esta muestra fué tomada a los 60 días de edad de los cultivos.

El líquido metabólico siguió presentando una coloración marrón - rojiza y un pH de 8,1.

El peso de micelio procedente de las 5 matraces fué de 4,8066 gr; correspondiendo 0,9613 gr. por matras. Se tomaron 4,7400 gr. de micelio triturado, y a partir de esta cantidad exacta fué llevada cabo la primera extracción con disolventes orgánicos.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a un proceso de extracción con éter de petróleo (50° - 70° C.), durante 20 horas, la grana obtenida pesó 0,8544 gr. lo que representa el 18,0 % respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de ésta fracción (extracto etéreo más volátiles), fué de 0,2719 gr. lo que representa el 5,7 % del peso del micelio seco inicial.

El peso del micelio después de estas dos extracciones fué de 3,6137 gr. por tanto la primera y segunda fracciones representan una pérdida de peso en el micelio inicial de un 23,7%.

T A B L A I X .

La tabla siguiente agrupa todos los datos relativos a la novena muestra. (60 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,1.
Color del líquido de cultivo	marrón-rojizo.
Peso del medio.	4,8066 gr.
Gramos de micelio por matraz.	0,9613 gr.
I Fracción.	18,0 gr %.
II Fracción.	5,7 gr %.
Peso del micelio extraído por disolvan tes orgánicos.	3,6137 gr.

Decima muestra.

Fuó tomada a los 66 días de edad de los cultivos. El líquido metabólico presentó una coloración marrón-rojiza y un pH de 8,0.

El micelio procedente de los 5 matraces pesó 4,5191 gr. correspondiendo 0,9038 gr. por matras. Respecto a las muestras anteriores el pH permaneció constante.

Una vez triturado el micelio, se pesó nuevamente, para llevar a cabo la primera extracción con disolventes orgánicos a partir de una cantidad conocida de micelio. Su peso fué de 4,4840 gr.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a un proceso de extracción con éter de petróleo (50° - 70° C)., durante 20 horas. Una vez evaporado el disolvente la grasa obtenida pesó 0,7404 gr., lo que representa el 16,5% respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de esta fra-

cción (extracto etéreo más volátiles) fué de 0,2518 gr. que representan el 5,6% respecto del peso del micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extracciones fué de 3,4918 gr. Así pues la primera y segunda fracciones representan una pérdida de peso en el micelio inicial de un 22,1 %.

c) Extracción con agua fría.

Un gramo de micelio residual fué extraído con agitación mecánica con 100 ml. de agua destilada, a la temperatura ambiente, durante una hora. Esta operación como siempre se efectuó tres veces consecutivas; análogamente la última extracción fué despreciada. El micelio extraído pesó 0,7458 gr., por lo que el agua extrajo:

$$1,0000 - 0,7458 = 0,2542 \text{ gr.}$$

El estudio de este extracto se realizó en tres partes:

I.- Determinación cualitativa de azúcares por cromatografía sobre papel.

En esta muestra quedaron caracterizados los siguientes azúcares y polialcoholes dados por orden de mayor desplazamiento:

to en cromatografía:

Manitol.

Glucosa.

Maltosa (indicación).

Como se observa a los 66 días de edad de los cultivos desaparece la Maltosa.

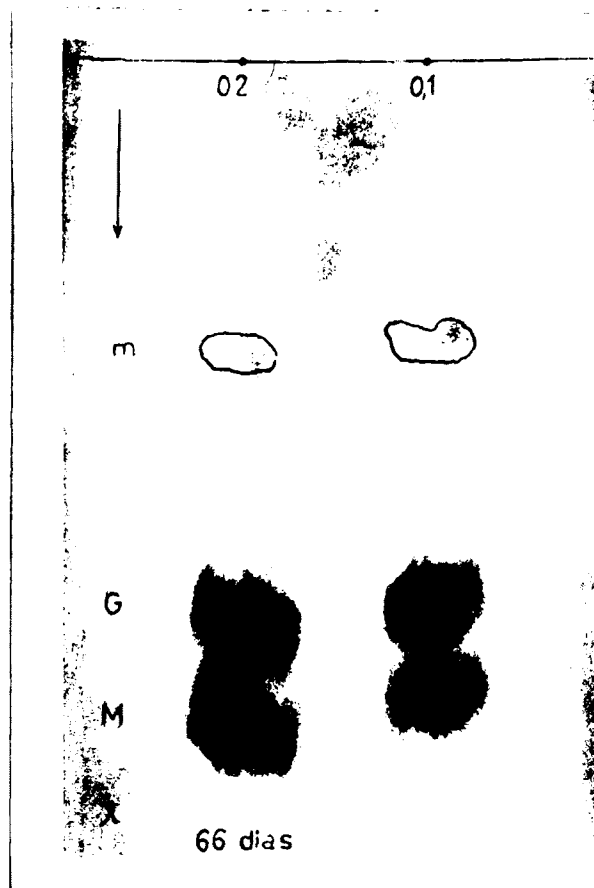


Fig. 10.- Cromatografía correspondiente a la decima muestra (66 días de incubación).

II.- Determinación cuantitativa de manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las manchas obtenidas en cromatografía con un densitómetro Elphor. Los datos obtenidos son:

La densitometría de la mancha de manitol producida por 0,1 ml. del líquido problema dió una superficie de 320 mm^2 , correspondiendo a esta superficie 17,5 % de manitol (Ver gráfica pag. nº 42), a 200 ml. le corresponderán 35,0 mgr., los cuales representan el 2,72 % del peso del micelio seco inicial.

III.- Determinación cuantitativa de azúcares reductores totales.

Método de Somogyi.

Para el control se gastó 20,8 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 19,2 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 17,4 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Hallando las diferencias entre el blanco y la muestra se obtiene.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 1,6 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 3,4 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$.

Como se ve guardan una relación lineal. Para 3,4 ml. de $S_2O_3^{2-}$, corresponden 0,432 mgr. de azúcares reductores (Ver gráfica pag. nº 34.), como estos corresponden a 4 ml. de la muestra a 200 ml. le corresponderán 21,6 mgr. que provienen de un gramo de micelio extraído por disolventes orgánicos y equivalen a 1,68 % de micelio seco inicial.

d) Determinación del fósforo.

Se partió de 100,0 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó materia orgánica.

Después su volumen se llevó a 100 ml. en un matras aforado. Se tomaron muestras de 4, 5, y 6 ml. respectivamente. Los datos obtenidos son:

<u>Volumen sol.</u> <u>problema.</u>	<u>lecturas uni</u> <u>dades Klett.</u>	<u>Concentración.</u>	<u>Media.</u>
4 ml.	226 u.K.	39,0 %	
5 ml.	320 u.K.	46,5 %	9,62 % / ml.
6 ml.	400 u.K.	59,0 %	

Para ver la equivalencia entre u.K. y concentración, ver gráfica pag. nº 48.

1 ml. de solución equivale a 1mg. de micelio.

1 mgr. tiene. 9,62 γ

1 gr. tiene. 9620 γ = 9,62 mgr.

El fósforo representa el 0,962 gr. % del micelio.

e) Determinación del Mg.

Se partió de 100,0 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó materia orgánica.

Su volumen se llevó a 10 ml. en un matraz aforado.

Se tomaron muestras de 1,5 y 3 ml., después de neutralizadas a pH 7-8 con NaOH N, se completó su volumen a 10 ml. con agua destilada. A continuación se agregaron 2 ml. de solución tampón, 2 ml. de CNK y 5 gotas de negro de eriocromo T; y se valoró con la solución E.D.T.A.

<u>Solución del micelio.</u>	<u>ml. de E.D.T.A.</u>	<u>Media.</u>
1,5 ml.	2,1 ml.	
3,0 ml.	4,3 ml.	1,4 ml.

1 ml. de solución E.D.T.A. = 22,22 γ de Mg.

1 ml. de solución del micelio tiene. 10 mgr. de
10 mgr. de micelio tienen. 31,108 mg.

El Mg. representa el 0,311 % del peso del micelio.

TABLA II.

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la decima muestra (66 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,0.
Color del líquido de cultivo.	amarillo - rojizo.
Peso del micelio seco.	4,5191 gr.
Granos de micelio por muestra.	0,9038 gr.
I Fracción.	16,5 gr %.
II Fracción.	5,6 gr %.
Peso micelio extraído por disolventes orgánicos.	1,4918 gr.
Peso del residuo de la extracción con Na.	0,7458 gr.
Azúcares caracterización.	Glucosa, Maltosa y Mani- tol.
Manitol.	2,72 gr %.

Asfoares reductores totales.	1,68 gr%.
Fósforo.	0,962 gr%.
Magnesio	0,311 gr%.

Undecima muestra.

Esta muestra fué tomada a los 72 dias de edad de los cultivos.

El líquido metabólico siguió presentando una coloración marrón-rojiza y un pH de 8,1.

El peso de micelo procedente de los 5 matraces fué de 4,1856 gr, correspondiendo 0,8371 gr. por matraz. Se pulverizó el micelio y de esto se tomaron 4,1428 gr. A partir de esta cantidad se procedió a la extracción con disolventes orgánicos.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a un proceso de extracción con éter de petróleo (50° - 70° C.) durante 20 horas. La grasa obtenida pesó 0,6568 gr. lo que representa el 15,8 % respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción

con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de esta fracción (extracto éteres más volátiles) fué de 0,1823 gr. lo que representa el 4,3 % del peso del micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extracciones fué de 3,3037 gr., por tanto la primera y segunda fracciones representan una pérdida de peso en el micelio inicial de un 20,1 %.

TABLA XI.

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la undécima muestra (72 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,1.
Color del líquido de cultivo.	marrón - rojizo.
Peso del micelio.	4,1856 gr.
Gramos de micelio por matras.	0,8371 gr.
I Fracción.	15,8 gr %.
II Fracción.	4,3 gr %.
Peso del micelio extraído por disolventes orgánicos.	3,3037 gr.

Doodecima muestra.

Fuó tomada a los 78 dias de edad de los cultivos.

El líquido metabólico presentó una coloración marrón-rojiza y un pH de 8,2.

El micelio procedente de los 5 matraces pesó 4,1128 gr. correspondiendo 0,8225 gr. por matraz.

El micelio triturado pesó 4,0729 y a partir de ésta cantidad exacta fué llevada a cabo la primera extracción con disolventes orgánicos.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a extracción con éter de petróleo (50° - 70°), durante 20 horas, la grasa obtenida pesó 0,6277 gr. lo que representa el 15,4% respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de esta fracción (extracto etéreo más volátiles) fué de 0,2319 gr. que repre-

sentan el 5,6 % respecto del peso del micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extracciones fué de 3,2123 gr., así pues la primera y segunda fracciones representan una pérdida de peso en el micelio inicial de un 21,0 %.

c) Extracción con agua fría.

Un gramo de micelio residual fué extraído con agitación mecánica con 100 ml. de agua destilada a la temperatura ambiente, durante una hora. Esta operación como siempre se efectuó tres veces consecutivas; análogamente la última extracción fué despreciada. El micelio extraído pesó 0,7470 gr. por lo que el agua extrajo:

$$1,0000 - 0,7470 = 0,2530 \text{ gr.}$$

El estudio de este extracto se realizó en tres partes.

I.- Determinación cualitativa de azúcares por cromatografía sobre papel.

En esta muestra quedaron determinados los siguientes azúcares y polialcoholes dados por orden de mayor desplazamiento en la cromatografía.

Manitol.

Glucosa.

Maltosa (indisiclos).

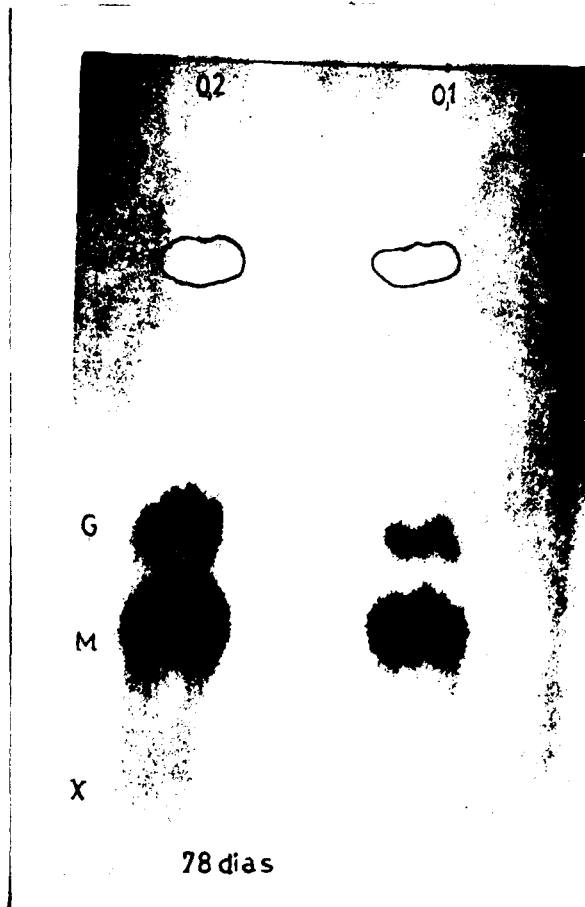


Fig. 11.- Cromatografía correspondiente a la duodécima muestra. (78 días de incubación).

II.- Determinación cuantitativa de manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las manchas obtenidas en cromatografía con un densitómetro Elpher. Los datos obtenidos son:

La densitometría de la mancha de manitol producida por 0,1 ml. de líquido problema dió una superficie de 336 mm^2 . correspondiendo a esta superficie 18,5 % de manitol (ver grafica pag. nº 42), a 200 ml. le corresponderán 37 mgr. lo cuales representan el 2,91 % del peso del micelio inicial.

III.- Determinación cuantitativa de azúcares reductores totales.

Método de Somogyi.

Para el control se gastó 208 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 19,5 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 18,2 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Hallando las diferencias entre el blanco y la muestra se obtiene.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 1,3 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 2,6 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Como se ve guardan una relación lineal. Para 2,6 ml. de

$S_2O_3^{2-}$, corresponden 0,351 mgr. de azúcares reductores (ver gráfica pag. nº 34.), como estos corresponden a 4 ml. de la muestra a 200 ml. le corresponderán 17,5 mgr. que provienen de un gramo de micelio extraído por disolventes orgánicos y equivalen a 1,38 % del micelio seco inicial.

d) Determinación del fósforo.

Se partió de 100,0 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó materia orgánica.

Después su volumen se llevó a 100 ml. en un matraz afe-
rado. Se tomaron muestras de 4, 5 y 6 ml. respectivamente.

Los datos obtenidos son:

<u>Volumen sol.</u> <u>problema.</u>	<u>Lecturas uni-</u> <u>dades Klett.</u>	<u>Concentración.</u>	<u>Media.</u>
4 ml.	191 u.K.	28 γ	
5 ml.	202 u.K.	30 γ	6,76 γ / ml.
6 ml.	300 u.K.	44 γ	

1 ml. de solución equivale a 1 mgr. de micelio.

1 mgr. tiene. 6,76 γ

1 gr. tiene. 6760 γ = 6,76 mgr.

El fósforo representa el 0,676 gr% del micelio.

e) Determinación del Mg.

Se partió de 100,0 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó materia orgánica. Su volumen se llevó a 10 ml. en un matras aforado.

Se tomaron muestras de 3 y 4 ml. después de neutralizadas a pH, 7 - 8, con NaOH N., se completó su volumen a 10 ml. con agua destilada. Después se agregaron 2 ml. de solución tampón, 2 ml. de CHK y 5 gotas de negro de eriocromo T, y se valoró con solución E.D.T.A.

<u>Volumen sol.</u> <u>problema.</u>	<u>ml. de E.D.T.A.</u>	<u>Medio.</u>
3 ml.	3,7 ml.	1,22.
4 ml.	4,9 ml.	

1 ml. de solución E.D.T.A. = 22,22 γ de Mg.

1 ml. de solución del micelio tiene. 10 mgr. de micelio.

10 mgr. de micelio tienen. 26,664 γ de Mg.

El Mg. representa el 0,266 % del peso del micelio.

T A B L A XII.

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la duodécima muestra (78 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,20.
Color del líquido de cultivo.	marrón - rojizo.
Peso del micelio.	4,1128 gr.
Granos de micelio por matraz.	0,8225 gr.
I Fracción.	15,4 %
II Fracción.	5,6 %
Peso del micelio extraído por disolución de orgánicos.	3,2133 gr.
Peso del residuo de la extracción acuosa.	0,7470 gr.
Asícaros caracterizados.	Glucosa, Maltosa, y Manitol.
Manitol.	2,91 gr %.
Asícaros reductores totales.	1,38 gr %.
Fósforo.	0,676 gr %.
Magnesio.	0,266 gr %.

Decimo tercera muestra.

Esta muestra fué tomada a los 84 días de edad de los cultivos.

El líquido metabólico siguió presentando una coloración marrón-rojiza y un pH = 8,1.

El peso de micelio procedente de los 5 matraces fué de 4,0615 gr. correspondiendo 0,8123 gr. por matras.

El micelio triturado pesó 3,9834 gr. y a partir de esta cantidad fué llevada a cabo la primera extracción con disolventes orgánicos.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a extracción con éter de petróleo (50° - 70° C.), durante 20 horas. Evaporado el disolvente, la grasa obtenida pesó 0,6047 gr. lo que representa el 15,8% respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de esta fracción

(extracto etéreo más volátiles), fué de 0,2213 gr. que representan el 5,5 % del peso del micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extracciones fué de 3,1574 gr. por tanto la primera y segunda fracciones representan un 20,6 % del peso del micelio seco inicial.

T A B L A X I I I .

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la decimotercera muestra. (84 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,1.
Color del líquido de cultivo.	narrón-rojizo.
Peso del micelio.	4,0615 gr.
Gramos de micelio por matraz.	0,8123 gr.
I Fracción.	15,1 gr %.
II Fracción.	5,5 gr %.
Peso del micelio extraído por disolventes orgánicos.	3,1574 gr.

Decimocuarta muestra.

Fuó tomada a los 90 días de edad de los cultivos.

El líquido metabólico presentó una coloración marrón-rojiza y un pH de 8,1.

El micelio procedente de los 5 matraces pesó 3,6322 gr. correspondiéndole 0,7264 gr. por matraz.

Del micelio, una vez triturado, solamente se tomó 1,4123 gr; y a partir de esta cantidad fué llevada a cabo la primera extracción con disolventes orgánicos.

a) I Fracción.

El micelio fué sometido a un proceso de extracción con éter de petróleo (50° - 70° C), durante 20 horas, la grasa obtenida pesó 0,1968 gr, que representan el 13,9 % respecto del micelio seco inicial.

b) II Fracción.

El micelio fué sometido a un segundo proceso de extracción con éter sulfúrico durante 20 horas. El peso de esta fracción (extracto etéreo más volátiles), fué de 0,038 gr. que representan el 2,6 % respecto del peso del micelio seco inicial.

El peso residual de micelio después de estas dos extra-

cciones fué de 1,1776 gr., así pues la primera y segunda fracciones representan una pérdida de peso en el micelio inicial de un 16,5%.

c) Extracción con agua fría.

Un gramo de micelio residual fué extraído con agitación mecánica en 100 ml. de agua destilada, a la temperatura ambiente durante una hora. Esta operación como siempre se efectuó tres veces consecutivas; análogamente la última extracción fué despreciada. El micelio extraído pesó 0,7927 gr. por lo que el agua extrajo:

$$1,0000 - 0,7927 = 0,2073 \text{ gr.}$$

El estudio de este extracto se realizó en tres partes:

I.- Determinación cualitativa de azúcares por cromatografía sobre papel.

En esta muestra quedaron determinados cualitativamente los siguientes azúcares y polialcoholes dados por orden de mayor desplazamiento en cromatografía.

Manitol.

Glucosa.

Maltona. (indicios).

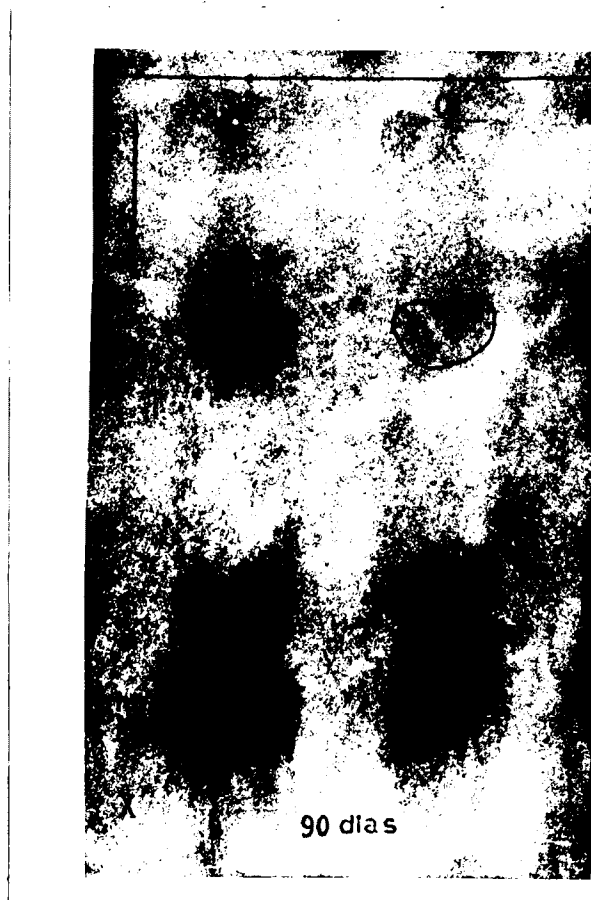


Fig. 12.- Cromatografía correspondiente a la muestra oatoroa (90 días de incubación).

II.- Determinación cuantitativa de manitol.

Se llevó a cabo midiendo la intensidad de las manchas obtenidas en cromatografía con un densitómetro Elphor. Los datos obtenidos son:

La densitometría de la mancha de manitol producida por 0,1 ml. de líquido problema dió una superficie de 160 mm^2 , correspondiendo a esta superficie 8 de manitol (Ver gráfica pag. nº 42.), a 200 ml. le corresponderán 16,0 mgr., los cuales representan el 1,33% del peso del micelio inicial.

III.- Determinación cuantitativa de azúcares reductores totales.

Método de Somogyi.

Para el control se gastó 20,8 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 2 ml. se gastó 20,1 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 19,4 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Hallando las diferencias entre el blanco y la muestra se obtiene:

Para la muestra de 2 ml. se gastó 0,7 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Para la muestra de 4 ml. se gastó 1,4 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$.

Como se ve guardan una relación lineal. Para 1,4 ml. de $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$, corresponden 0,189 mgr. de azúcares reductores (ver gráfica pag. nº 34), y como estos corresponden a 4 ml. de la muestra a 200 ml. le corresponderán 9,45 gr. que provienen de un gramo de

micelio extraído por disolventes orgánicos y equivalen a 0.78 % del peso del micelio seco inicial.

4) Determinación del Fósforo.

Se partió de 100,0 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó materia orgánica.

Después su volumen se llevó a 100 ml. en un matras aforado. Se tomaron 4, 5 y 6 ml. respectivamente. Los datos obtenidos son:

<u>Volumen sol.</u> <u>problema.</u>	<u>Lecturas uni</u> <u>dades Klett.</u>	<u>Concentración.</u>	<u>Medio.</u>
4 ml.	91 u.K.	13,5 γ	
5 ml.	120 u.K.	16,5 γ	3,44 γ / ml.
6 ml.	151 u.K.	22,0 γ	

Para ver la equivalencia entre u.K. y concentración ver gráfica pag. n° 48.

1 ml. de solución equivale a 1 mgr. de micelio.

1 mgr. tiene. 3,44 γ

1 gr. tiene. 3,44 mgr.

El fósforo representa el 0,344 gr% de micelio.

e) Determinación del Mg.

Se partió de 100,0 mgr. de micelio. Se carbonizó y eliminó la materia orgánica. Su volumen se llevó a 10 ml. en un matraz aforado. Se tomaron muestras de 3 y 5 ml., después de neutralizados a pH 7 - 8, con NaOH N., se completó su volumen a 10 ml. con agua destilada. Después se agregaron 2 ml. de solución también, 2 ml. de CNK y 5 gotas de negro de eriocromo T, y se valoró con solución E.D.T.A.

<u>Volumen sol. problema.</u>	<u>ml. de E.D.T.A.</u>	<u>Medio.</u>
3 ml.	2,3 ml.	0,74.
5 ml.	3,6 ml.	

1 ml. de solución E.D.T.A. = 22,22 γ de Mg.

1 ml. de solución del micelio tiene. . 10 mgr. de micelio.

10 mgr. de micelio tienen. 16,4428 γ

El Mg. representa el 0,164 % del peso del micelio.

T A B L A X I V .

La tabla siguiente agrupa los datos relativos a la muestra cateteros. (90 días de incubación).

pH del líquido de cultivo.	8,1.
Color del líquido de cultivo.	narrón-rojizo.
Peso del micelio.	3,6322 gr.
Gramos de micelio por matraz	0,7264 gr./ matraz.
I Fracción.	13,9 gr %.
II Fracción.	2,6 gr %.
Peso del micelio extraído por disolven tes orgánicos.	1,1776 gr.
Peso del residuo de la extracción acuosa.	0,7927 gr.
Azúcares caracterizados.	Glucosa, Maltosa y Mani tol.
Manitol.	1,33 gr %.
Azúcares reductores totales.	0,78 gr %.
Fósforo.	0,344 gr %.
Magnesio.	0,164 gr %.

COMPENDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO.

I.- Variación del pH en el líquido metabólico durante el período de incubación (días)

Días	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
pH	4,10	4,00	4,65	8,00	8,10	8,10	8,10	8,10	8,10	8,10	8,10	8,20	8,10	8,10

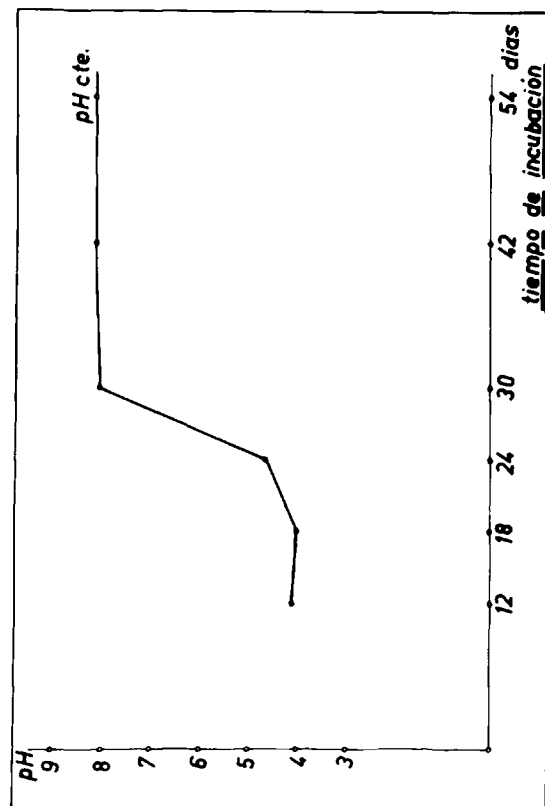


Fig. 12-

II.- Variación del peso del micelio grueso por matras durante el periodo de incubación (días).

Días	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
grs.	0,8495	1,0708	1,2129	1,2831	1,1840	1,0741	1,0198	0,9880	0,9613	0,9038	0,8371	0,8225	0,8123	0,7264

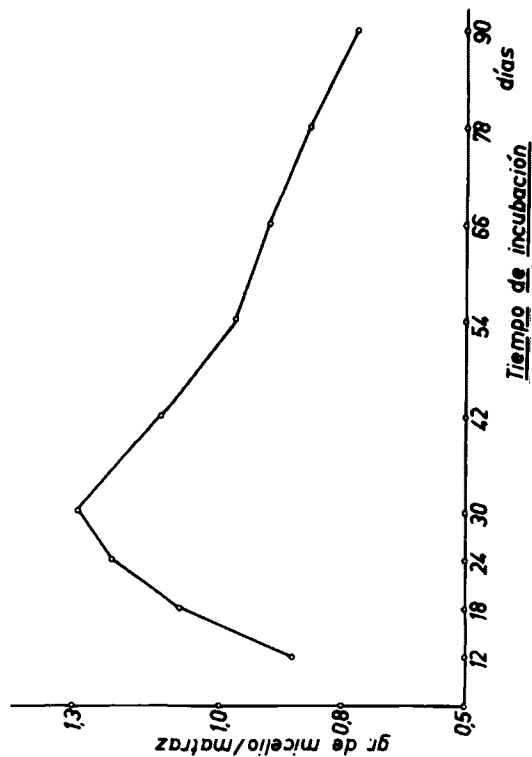


Fig. 13-

III.- Variación en peso de la fracción primera (extracto en éter de petróleo p.e. 50° - 70° C.) durante el período de incubación. (Afas).

Días	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
grs.-g	29,3	23,0	22,3	21,0	19,6	16,4	16,5	18,2	18,0	16,5	15,8	15,4	15,1	13,9

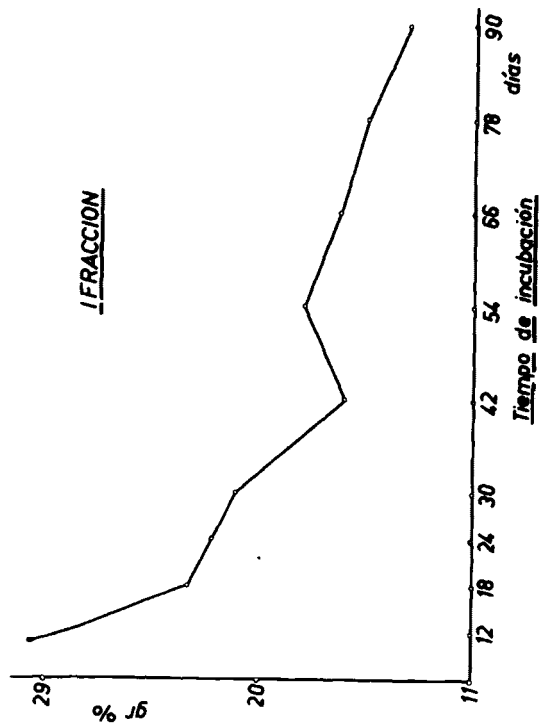


Fig. 14-

IV.- Variación en peso de la fracción segunda (extracto en éter sulfúrico) durante el período de incubación (afas).

Días	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
grm. %	5,7	13,2	11,0	10,1	7,4	7,7	7,4	5,7	5,7	5,6	4,3	5,6	5,5	2,6

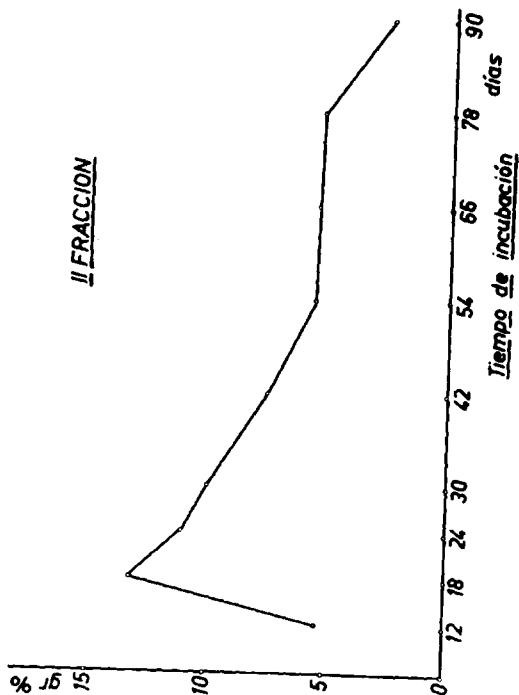


Fig. 15-

V.- Variación del total de azúcares reductores durante el periodo de incubación (días).

Días	12	18	24	30	42	54	66	78	90
grm-%	0,57	0,51	1,69	1,39	1,64	2,05	1,68	1,38	0,78

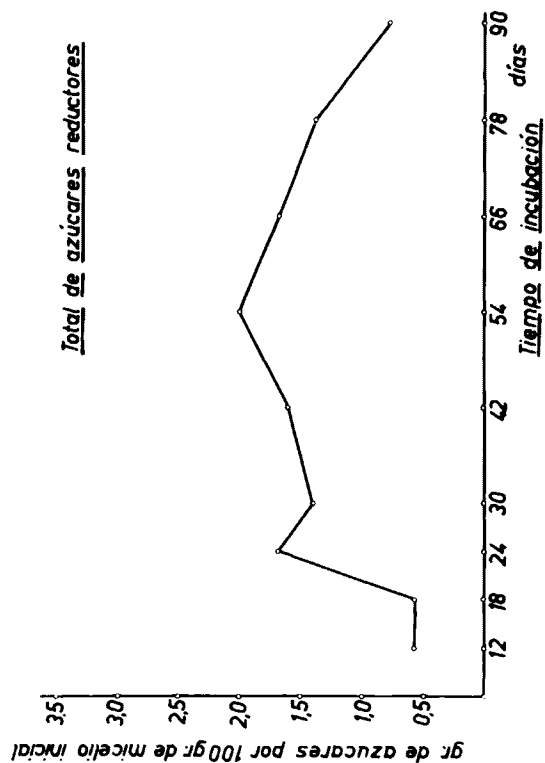


Fig. 16.-

Fig. 17.- Variación del manitol durante el periodo de incubación (afan).

Días	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
gr. de manitol por 100 gr. de micelio inicial	3,17	3,26	2,53	2,69	3,91	3,80	2,72	2,91	1,33					



Fig. 17.-

VII.- Variación del fósforo existente en el micelio durante el periodo de autólisis (días).

Días	30	42	54	66	78	90
gr. %	1,980	1,765	1,255	0,962	0,676	0,344

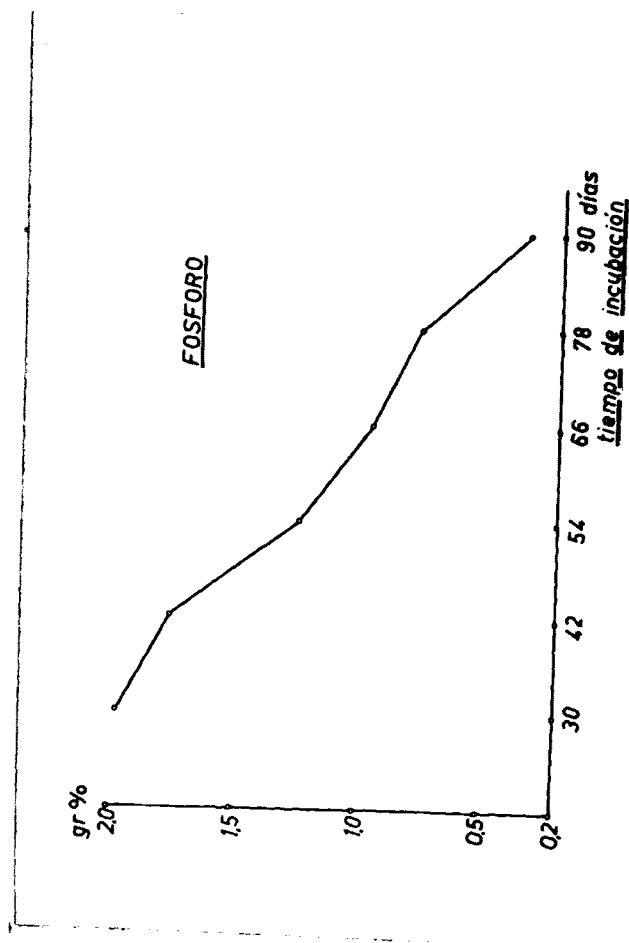


Fig. 18.-

VIII.- Variación del magnesio existente en el micelio durante el período de autólisis (días).

Días	30	42	54	66	78	90
gr-%	0.400	0.377	0.342	0.311	0.266	0.164

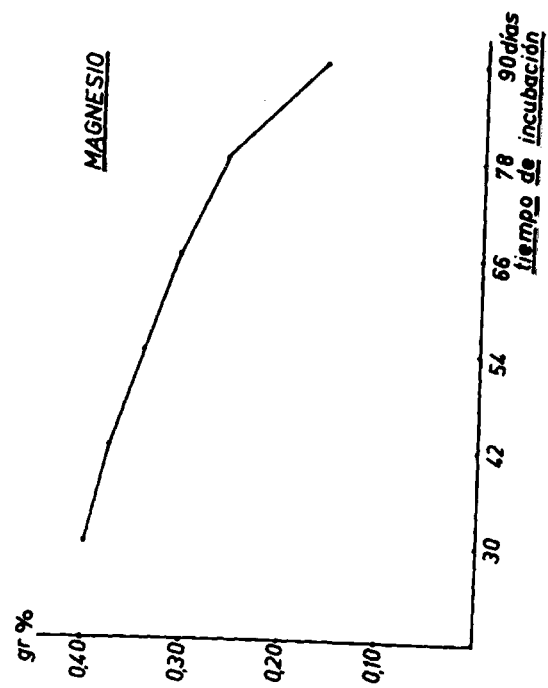


Fig. 18-

DISCUSION.

Es sabido que el crecimiento de un hongo sobre una cantidad limitada de un determinado medio de cultivo artificial disminuye gradualmente hasta que finalmente cesa. Entonces se dice que el cultivo ha entrado en la fase estacionaria. La fase que sigue a esta fase estacionaria es la terminal y recibe el nombre de fase autolítica del crecimiento ó autólisis y cuyo estudio constituye el objeto primordial del presente trabajo.

Existen dos hipótesis sobre las causas que activan la iniciación de la autólisis. De un lado, los que adscriben este fenómeno a la desaparición de los nutrientes, ó de un determinado nutriente esencial y la otra, a la naturaleza inhibitoria de los productos metabólicos formados ó de uno determinado de estos. La conclusión a la que parecen llegar todos los autores, que de estas cuestiones tratan, es que los dos factores, agotamiento del alimento (substrato) y acumulación de productos metabólicos son igualmente importantes en reducir la rapidez del crecimiento.

De cualquier forma resulta difícil incluso decidir el comienzo de la fase de autólisis en un cultivo determinado que se

tiene en observación. El criterio seguido por algunos, y así se ha hecho en este trabajo, es el de considerar iniciada la fase de autólisis cuando se llega al peso máximo de micelio y este comienza a decrecer. Sin embargo en ninguno de estos casos existe una separación bien definida, como ocurre en todos los fenómenos biológicos. Es difícil establecer un límite y decir cuándo acaba el crecimiento y comienza la autólisis, ni siquiera puede decirse que ambos, al menos en parte, no se dan simultáneamente. G. Behr (1930) (2) observa que en el momento en que se llega al peso máximo de micelio coexisten la autólisis y el crecimiento, si bien predomina la primera.

En el trabajo aquí expuesto con el Aspergillus terreus creemos haber observado de acuerdo con Behr (1930) (2), una autólisis simultánea con crecimiento ya que entre los 12 y los 18 días de incubación comienza a producirse una pérdida en el contenido en grasa (1) del micelio y sin embargo no se pudo observar ningún signo aparente de haber comenzado la autólisis. Es más apesar de

(1) Si como se verá después, se toma como criterio de iniciación de la autólisis la desaparición de grasa y carbohidrato del micelio entonces tendríamos que admitir que la autólisis había comenzado antes de los 12 días de incubación.

esta pérdida de grasa el micelio continuaba aumentando de peso por lo que cabe pensar en que según la fase de crecimiento.

Además, el cambio brusco ocurrido en el valor del pH entre los días 24 y 30 días de incubación nos condujo a pensar que la autólisis comenzó de manera insoslayable entre los días señalados, por lo que cuando el período de autólisis se ha establecido la desaparición total de grasa ha sido ya bastante considerable.

En la tabla que sigue, extracto de la Tabla pag. 145, se expresa mediante flechas el período en el que se produce el cambio a que nos hemos referido anteriormente:

<u>Incubación días.</u>	<u>Micelio grm.</u>	<u>Grasa %</u>	<u>pH.</u>
12	4.266	29.0	4.10
18	5.3549	23.0	4.00
→ 24	6.0649	22.2	4.65 ←
→ 30	6.1757	21.0	8.00 ←

El único trabajo que hemos hallado en la literatura referente a la variación en el contenido de grasa durante el período de autólisis ha sido las experiencias efectuadas por Peters-

son, y colaboradores trabajando con el Aspergillus fischeri. En estas experiencias se establece que la cantidad absoluta de grasa comenzaba a decrecer a partir de los 10 días de incubación. La grasa decrecía más rápidamente que la suma de los otros componentes del micelio, hasta que hacia los 40 días de incubación todos decrecían en la misma proporción, de manera que el porcentaje de grasa contenido en el micelio decreció de 23,3 á 11,6% para después permanecer constante.

En las experiencias aquí descritas motivo de esta tesis se encontró que el contenido en grasa del micelio del Aspergillus terreus disminuía a medida que aumentaba el tiempo de autólisis, de manera que la disminución en el contenido de lípidos comienza aún antes de iniciarse la fase de autólisis. En los datos obtenidos que hemos expresado en la parte experimental de este trabajo se ve claramente que el contenido de grasa disminuye continuamente desde los 12 días hasta los 90 días de incubación. A este mismo resultado parece llegar Petersen y colaboradores en el trabajo antes citado, pues aunque no se menciona el tiempo de iniciación de la autólisis en estos experimentos podemos muy bien suponer que esto ocurre después de los 10 días de incubación.

Para Dorr y Maynard (14) la autólisis es la digestión de los tejidos del propio microorganismo y esta aumenta a medida que se agota el carbohidrato presente en el medio. Así mismo se produce una restauración al medio de una gran parte del nitrógeno previamente asimilado por el organismo que se estudia, hasta que se establece el equilibrio y el nitrógeno parece permanecer constante.

Estas ideas vienen confirmadas casi continuamente por los observadores actuales los que describen la autólisis como un proceso en el que se produce la disolución lenta y continua del material organizado del micelio (Borror, Jefferys, Kennell, Lloyd, Lloyd y Nixon (1.961) (6). Esto se caracteriza por una pérdida en el contenido celular seguida de un retorno de fosfatos, aminoácidos, magnesio y potasio al medio. Así mismo algunos investigadores observan un decrecimiento en el contenido de grasa y carbohidratos en el micelio durante la fase autolítica del crecimiento (Borror, Jefferys, Kennell, Lloyd, Lloyd y Nixon) (1.961) (6).

En este punto precisamente nuestra experiencia trabajando con el Aspergillus terreus no coincide totalmente con este criterio en lo que respecta a los carbohidratos. Mientras que el con-

tenido de lípidos en el micelio decrece continuamente a lo largo del período de autólisis no parece posible aplicar esta generalización al caso de los carbohidratos. En nuestros resultados pag. 147, se observa que la cantidad de azúcares libres continúa aumentando una vez iniciada la autólisis y que este aumento continúa a pesar de hallarse el cultivo en período de franca autólisis. Alcanzado un valor máximo, a los 54 días de autólisis, la concentración comienza a decrecer y así continúa hasta los 90 días de incubación aquí estudiados. Sumamente escasos en la literatura los trabajos relativos a la bioquímica de la fase autolítica del crecimiento por lo que se hace difícil establecer comparaciones en el comportamiento de otros microorganismos en la citada fase. De cualquier manera el resultado referente a la concentración de carbohidratos libres presentes en el micelio que se acaba de exponer difiere notablemente de los resultados expuestos por Tandon y Chandra (44) trabajando con micelio de Colletotrichum gloeosporioides crecido también en un medio sintético. Estos autores observaron que durante los estados iniciales de autólisis el micelio del citado microorganismo tenía una alta concentración de sacarosa y de maltosa. A medida que la autólisis tenía lugar

la concentración de los mismos disminuía lenta y continuamente hasta que finalmente desaparecía por completo.

A continuación, y por su analogía química con los azúcares pasamos a discutir el comportamiento del manitol. La variación en el contenido de manitol existente en el micelio del *Aspergillus terreus* durante la autólisis fue seguida cromatográficamente mediante lecturas densitométricas de las manchas resultantes en la cromatografía sobre papel producidas por el manitol.

Representando gráficamente concentraciones de manitol, y tiempo resulta la gráfica (fig. 17) representada en la pag. 148.

Curvas análogas a esta fueron obtenidas por Jermy y Isherwood (1956) (25) en el examen de la variación en la concentración total de posiconáridos contenidos en las peras durante el proceso de maduración de las mismas.

La dificultad existente para hallar un método colorimétrico preciso que permitiese determinar el manitol en líquidos biológicos (debido a la no existencia de reacciones coloreadas para este cuerpo) nos hizo pensar en principio en el método polarimétrico de determinación del manitol, en presencia de glucosa

debido a Baistrick y Young (15). El método se funda en que al añadir bases a una solución de manitol, esta se hace ópticamente activa. Este método, como anteriormente se dice, permite determinar el manitol en presencia de glucosa. Ahora bien en los extractos azucareros en los que se presenta el manitol, existe también la glucosa, xilosa y tramas de maltosa, según se vió dando las primeras cromatografías que se hicieron al principio de estas experiencias. Aunque la maltosa se halla, en cantidades muy pequeñas, como en la parte experimental, se dice, se pudo hacer caso omiso de su presencia. Sin embargo no podíamos hacer lo mismo con la xilosa la cual se halla en cantidades bastante mayores que la maltosa si bien muy inferiores a las del manitol. En cualquier caso dado que ambos carbohidratos, xilosa y maltosa interfieren con sus actividades ópticas en la determinación del manitol se decidió abandonar el procedimiento que se acaba de citar y adoptar el densitómetro.

Finalmente, es conocida la existencia de dos tipos de autólisis la llamada autólisis ácida y la alcalina. La primera tiene lugar en medios cuya fuente nitrogenada se suministra al medio de cultivo en forma de nitrógeno amoniacal. Estos procesos autolíticos

cos llegan a transcurrir a muy bajos pHs, llegando en muchas ocasiones al valor 1,0. Este proceso se caracteriza por la disminución relativamente pequeña del peso del micelio, eliminación de sustancias orgánicas nitrogenadas y aumento del contenido en quitina hasta el final de la autólisis.

La autólisis alcalina tiene lugar cuando el nitrógeno del medio se halla presente en forma de nitrato (NO_3Na) y se caracteriza por una mayor pérdida de peso de micelio (mayor que en el caso de la autólisis ácida) ausencia de combinaciones orgánicas nitrogenadas en el líquido de cultivo, aparición de amoníaco, completa desaparición de quitina y aparición de sustancias de tipo "húmico".

En el Aspergillus terreus aquí estudiado, la autólisis es de carácter alcalino debido al NO_3^- que contiene el medio de Czapek-Dox utilizado. La pérdida total de peso de micelio es de un 42 % pérdida que resulta bastante considerable ya que a los 90^{os} días de incubación todavía continuaba perdiendo peso, por lo que resulta una pérdida del 42 % en 60 días de autólisis. Ello está en armonía con los resultados expuestos por G. Behr (1.930) (2), para el Aspergillus niger cultivado en un medio sintético de composición análoga al empleado para el Aspergillus terreus.

R E S U M E N.

Introducimos este trabajo con una revisión de las publicaciones halladas en la literatura referentes a la biología de la fase autólitica del crecimiento en hongos filamentosos.

En la presente investigación se ha hecho un estudio de ciertos aspectos de la biología de la fase de autólitis del Aspergillus terreus. Se ha cultivado este microorganismo durante un largo período de incubación (90 días) para así entrar plenamente en la fase de autólitis y estudiar este período de la vida del Asp. terreus que es el aspecto al que con preferencia hemos dedicado nuestra atención.

El medio de cultivo elegido para su incubación fue el de Campbell-Dor. Durante la fase de crecimiento y cada seis días se tomaban muestras del incubador que consistían en cinco matrazos. Llegada la fase autólitica del crecimiento se comenzaron a tomar aquellas cada doce días.

Se observó que llegadas las culturas a la fase de autólitis el pH experimentaba una subida brusca alcanzando el valor de 8,00 y conservándose este valor durante el resto del período de

incubación.

Las fracciones I y II (materiales extraíbles por disolventes orgánicos) decrecen continuamente desde la iniciación de la autólisis hasta el final del período de incubación.

A continuación, se hace un estudio de la variación cualitativa y cuantitativa de los azúcares libres existentes en el medio de AMP. TERRERA, durante la fase autolítica del crecimiento.

Hemos encontrado que la cantidad total de azúcares reducidos libres aumenta continuamente, incluso durante la fase de autólisis, llegando a un máximo a los 24 días de autólisis, seguida de una disminución en la cantidad de los mismos la cual continúa durante todo el período de tiempo aquí estudiado.

La glucosa y la xilosa se hallaban presentes en el medio en cantidades relativamente grandes. La xilosa solamente en trazas. La glucosa y la maltosa se hallaban presentes desde el comienzo de la autólisis, existiendo a lo largo de todo el experimento, mientras que la xilosa desaparecía a los 30 días de autólisis.

CONCLUSIONES.

1).- La autólisis sufrida por el Aspergillus terreus es fuertemente alcalina, de acuerdo con la fuente de nitrógeno suministrada en el medio de cultivo. (NO_3^-). Así mismo y a partir de los 30 días de incubación comienza a producirse un decrecimiento en el peso del micelio de acuerdo con las características básicas de la definición de la fase de autólisis.

2).- Esta pérdida de peso del micelio ha llegado a ser de un 42 % a los 90 días de incubación.

3).- Si se toma como criterio de iniciación de la autólisis el aumento del pH del líquido de cultivo y la disminución en el peso del micelio entonces la disminución en la cantidad de grasa contenida en el micelio de Aspergillus terreus comienza antes de iniciarse la fase autolítica del crecimiento.

4).- Se puede establecer que la fracción grasa es el componente que desaparece en mayor cantidad haciéndolo más deprisa, que los otros componentes del micelio que se han estudiado.

5).- Se ha seguido por vez primera la variación cualitativa de los azúcares libres existentes en el micelio del Asp. te-

reos durante la autólisis, comprobándose su existencia a lo largo de todo el período de incubación.

6).- Se ha encontrado glucosa, xilosa, y maltosa como azúcares libres presentes en el micelio del citado microorganismo durante la autólisis.

7).- Hemos demostrado que la cantidad total de azúcares libres existentes en el micelio del microorganismo objeto de este trabajo, aumenta continuamente, incluso durante la fase de autólisis, llegando a un máximo a los 24 días de autólisis (54 días de incubación). Alcanzado este máximo comienza a decrecer.

8).- La glucosa y la xilosa se hallan presentes en el micelio en cantidades relativamente grandes. La maltosa solamente en trazas. La glucosa y la maltosa se hallaban presentes desde el comienzo de la autólisis, existiendo a lo largo de todo el experimento, mientras que la xilosa desaparecía a los 20 días de autólisis.

9).- La concentración de manitol en el micelio fluctúa teniendo un máximo a los 12 días de autólisis, a partir de esta fecha el decrecimiento de la concentración se hace más marcado llegando a ser de 1,2% en la última muestra tomada.

B I B L I O G R A F I A.
=====

- 1.- BARBER. (1.927). J. Soc. Chem. Ind., vol. 46, p. 200 T.
- 2.- BEHR, G. (1.930). Arch. Mikrobiol. 1, 418 - 444.
- 3.- HELIN (1.926). Bull. Soc. Chim. Biol., vol. 8, p. 1081.
- 4.- BENSON, A.A., BASEHAM, J.A., CALVIN, M., HALL, A.G.,
HIRSCH, H.E., KANAGUCHI., S., LYNCH, V., y TOLBERT, H.E.
(1.952). J. Biol. Chem. 196., 703 - 716.
- 5.- BLOCK, R.J., DURREM, E.L., y ZWEIG. (1.958). "A manual
of paper chromatography and paper electrophoresis". (2^a
edición). Pag. 172 nota 18.
- 6.- BORROW, A., JEFFERYS, E.G., KESSELL, R.H.J., LLOYD, E.C.,
LLOYD, P.B., y NIXON J.S. (1.961) Can. J. Microbiol
7, - 227.
- 7.- BORTELS. (1.927). Biochem. Z. 182, 301 - 358.
- 8.- BOYLE, C. (1.924). Ann. Bot. XXXVIII, 113 - 35.

- 9.- BROWN, W. (1.923). Ann. Botany 37, 105 - 129.
- 10.- CONSDEN, R., GORDON, A.H., y MARTIN, A.J.P., (1.944).
Biochem. J., 38, 224.
- 11.- CREWTHIER, W.G., y LENNOX, F.G., (1.953). Australian J.
Biol. Sci. 6, 410 - 427.
- 12.- CHANG, S.C. (1.940). Soil. Sci. 49, 197 - 210.
- 13.- DOX, A.W. (1.913). J. Biol Chem. 16, 479 - 484.
- 14.- DOX, A.W., y MAYNARD, L. (1.912). J. Biol. Chem. 12,
227 - 231.
- 15.- EATHAN, M. (1.949) Biochem. J. 45, XIII - XIV.
- 16.- EHRLICH. (1.911). Ber. Dants. Chem. Ges., vol. 44,
p. 3737.
- 17.- EZIO EMILIANI Y UCHA, I. de DAVIE (1.962) Appl. Micro-
biol. vol. 10, n° 6 p. 505.
- 18.- FANCETT, H.S. (1.925) Ann. Appl. Biol. 12, 191 - 198.

- 19.- FISKE, C.H. y SUBBAROW, Y. (1.925) J. Biol. Chem. 66, 375.
- 20.- FOSTER, J.W., (1.949). "Chemical Activities of Fungi".
Academic Press Inc., New York.
- 21.- GARRIDO, J.M. y WALKER T.K. (1.956). Jour. Sci. Food
Agr., No. 4, pp. 233 - 237.
- 22.- HOCKENHULL, D.J.D. (1.946) Biochem. J. (London) 40,
337 - 343.
- 23.- HOCKENHULL, D.J.D. (1.950). J. Exp. Botany 1, 194-200.
- 24.- JEANES, A., WISE, C.S. y DIMICK, R.J. (1.951) Anal.
Chem. 23, 415 - 420.
- 25.- JERNYN M.A. e ISHERWOOD, F.A. (1.956) Biochem. J.
64. 127 - 132.
- 26.- KINOSHITA, K. (1.929) J. Chem. Soc. Japan, 50, 583-593.
- 27.- KLOTZ, L.J. (1.923). Ann. Missouri Botan. Garden 10,
299 - 368.

- 28.- LAHOZ, R. y RODRIGUEZ, D. (1.961) Microbiol. Españ. 14, 135.
- 29.- METZ (1.930). Arch. Mikrobiol 1, 197 - 251.
- 30.- MICHEL - DURAND, E. (1.938) Bull. Soc. Chim. Biol. 20, 339 - 412.
- 31.- MOLLIAED, C.R. (1.922). vol. 174. p. 881.
- 32.- PARTRIDGE, S.M. (1.947) Nature 158, 270 y (1.948) Biochem. J. 42, 238.
- 33.- PETRONICI, C. y SAFINA, G. (1.953) Conserve e deriv. agrumari (Palermo). 2 (5), 3 - 11.
- 34.- PRATT, C.A. (1.924) Ann. Bot. XIX, 563 - 95.
- 35.- RAISTRICK, H. y YOUNG, W. (1.931) Trans. Roy. Soc. London, 220 B, 173.
- 36.- RAISTRICK, H. y VINCENT J. M. (1.948) Biochem. J. (London) 43, 90 - 99.
- 37.- RIFEL, K. Y BEHR, G. (1.930) Arch. Mikrobiol 1, 271 - 276.

- 38.- RIFEL, K. y BEHR, G. (1.936) Arch. Mikrobiol. 7, 584 - 589.
- 39.- SAITO, K. (1.907). Botan. Mag. TOKYO 21, 7 - 11.
- 40.- SCHWARZENBACH, G. (1.959) Ediciones Atlas. MADRID.
- 41.- SEMENIUK, G. (1.944). Iowa. State. Coll. J. Sci. 18,
325, 358.
- 42.- SMITH, G. (1.945) "An Introduction to Industrial Micro-
logy". pag. 176. London, Edward Arnold and Co.
- 43.- SOMOGYI, M. (1.945). J. Biol - Chem., 160, 61.
- 44.- TANDON, R.N. y CHANDRA, S. (1.962). OIRON. 19 (2),
127 - 132, XII.
- 45.- THOM, C., y RAPER, K. B. (1.945) "Manual of the Aspergi-
lli" Baltimore. The Williams y Wilkins Co.
- 46.- TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. y HARRISON, J.S. (1.950)
Nature 166, 444 - 445.
- 47.- WARD, G.E., LOCKWOOD, L.B., MAY, O.E., y HERRICK, H.T.
(1.935). Ind. Eng. Chem., 27, 318.

- 48.- WEHMER (1.891). Bot. Z. vol. 49, p. 233.
- 49.- WEHMER (1.893). Beiträge Z. Kenntnis einheimischer Pilze, Hanover y Leipzig, 1892., y Sitz. K. Akad. Wiss., Berlin 1.893, p. 519.
- 50.- WEHMER (1.928). Biochem. Z., vol. 197, p. 418.
- 51.- WHISTLER, R.L. y WOLFSON, M.L. (1.962) "Methods in Carbohydrate Chemistry". vol. I, pag. 28.
- 52.- WOODLLEY, D.H. y PETERSON, W.H. (1.937). J. Biol. Chem. 114, 85 - 90.
-